

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL RECEPTOR P2X7
EN CÉLULAS NEURONALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Paula García Huerta

Bajo la dirección de las doctoras

**M^a Teresa Miras Portugal
Rosa Gómez Villafuertes**

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



Regulación transcripcional del receptor P2X7 en
células neurales.

TESIS DOCTORAL

Paula García Huerta
Madrid, 2013

La **Dra. M^a Teresa Miras Portugal**, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y la, **Dra. Rosa Gómez Villafuertes** Investigador Contratado del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que **Paula García Huerta**, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado "**Regulación transcripcional del receptor P2X7 en células neurales**" como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Marzo de 2013

VºBº DIRECTORES

Dra. M^a Teresa Miras Portugal

Dra. Rosa Gómez Villafuertes

La doctoranda:

Paula García Huerta

La realización de este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral para la formación de personal universitario del Ministerio de Educación y Ciencia. Asimismo, ha contado con la financiación de los proyectos BFU2008-02699/BFI, BFU 2011-24743, la Fundación Marcelino Botín, MEyC Consolider-Ingenio CSD2008_00005.

ABREVIATURAS

α, β-meATP	α , β -metilén-adenosina-5'-trifosfato
aa	Aminoácidos
ABC	ATP binding cassette
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPc	Adenosina-5'-monofosfato cíclico
Ap₄A	P ¹ ,P ⁴ -Di(adenosina-5')tetrafosfato
Ap₅A	P ¹ ,P ⁵ -Di(adenosina-5')pentafofato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BBG	Brilliant Blue G
BSA	Albúmina de suero bovino
BzATP	3'-O-(4-benzoil)benzoil adenosine-5'-trifosfato
[Ca²⁺]_i	Concentración intracelular de calcio ([Ca ²⁺] _i)
CaMK II	Ca ²⁺ -calmodulina quinasa II
CHO	Células de ovario de hámster chino
CKII	Quinasa de caseína II
CREB	Elemento de unión de respuesta a AMPc
CTP	Citosina 5'-trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EC₅₀	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
EDTA	Ácido etilén-diamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFP	<i>Enhanced GFP</i>
EGFR	Receptor de EGF
EMSA	Ensayo de cambio en el desplazamiento por electroforesis
E-NPPasa	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas
E-NTPDasa	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas
ERK	Quinasa regulada por señalización extracelular
FBS	Suero fetal bovino
Fura-2 AM	Fura-2 acetoximetil éster
GABA	Ácido-g-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GFP	Proteína verde fluorescente
GMPc	Guanosina-5'-monofosfato cíclico
GPRC	Receptores acoplados a proteínas G

GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa 3
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HM	Motivo hidrofóbico
IC₅₀	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto máximo
IP₃	Inositol trifosfato
JNK	Quinasa de c-Jun en N-terminal
KN-62	1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4phenylpiperazine
KO	Knock out
LB	Medio Luria
MAP	Proteína asociada a microtúbulos
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
miARN	micro ARN
mTOR	Proteína de mamífero diana de rapamicina
NANC	No-adrenérgicos no-colinérgicos
Nf-kB	Factor nuclear-kb
NGF	Factor de crecimiento neural
NP-40	Nonidet P-40
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PK-1	Quinasa dependiente de fosfoinositol-1
PFA	<i>p</i> -formaldheído
PH	Dominios de homología a plextrina
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP2	3,4-bifosfo-fosfatidilinositol
PIP3	3,4,5-trifosfo-fosfatidilinositol
PKB	Proteína quinasa B (Akt)
PKC	Proteína quinasa C
PKD	Proteína quinasa D
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP1/PP2A	Proteína fosfatasas 1 y 2A
PPADS	Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfónico
PS	Fosfatidilserina
Q-PCR	PCR cuantitativa
RARE	Elemento de respuesta al ácido retinoico
RTK	Receptor tirosina quinasa
RT-PCR	PCR por retrotranscripción
SBB	Sudan Black B
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SH2	Dominios de homología Src 2

SH3	Dominio de homología Src-3
shRNA	Ácido ribonucleico <i>small harpin</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
Sp1	Specificity protein factor 1
TM	Transmembrana
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UDP	Uridina 5'-difosfato
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VNUT	Transportador vesicular de nucleótidos
WB	Western Blot
WT	Fenotipo salvaje o <i>Wild type</i>

ÍNDICE

SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	33
1. El sistema purinérgico.	35
1.1. Los nucleótidos en la neurotransmisión.	35
1.2. Almacenamiento y liberación de nucleótidos.	36
1.3. Inactivación ecto-enzimática de los nucleótidos.	37
1.4. Receptores de nucleótidos.	38
1.5. Receptores metabotrópicos P2Y.	39
1.6. Receptores ionotrópicos P2X.	40
1.6.1. Características estructurales y oligomerización.	41
1.6.2. Propiedades farmacológicas.	44
1.6.3. Características funcionales y regulación de los receptores P2X.	44
1.7. El receptor P2X7.	47
1.7.1. Propiedades farmacológicas.	47
1.7.2. Características funcionales.	50
1.7.3. Papel del receptor P2X7 en el Sistema Nervioso.	51
2. Regulación de la expresión génica en eucariotas.	52
2.1. Fundamentos generales.	52
2.2. Proteínas reguladoras.	54
2.3. Regulación transcripcional de los receptores P2X.	56
2.3.1. Receptor P2X1.	56
2.3.2. Receptor P2X2.	57
2.3.3. Receptor P2X4.	58
2.3.4. Receptor P2X7.	59
3. Familia de factores de transcripción Sp1.	60
3.1. Introducción general.	60
3.2. Características estructurales.	63
3.3. Localización subcelular de las proteínas Sp.	65
3.4. Propiedades funcionales de las proteínas Sp.	66
3.4.1. El factor Sp1.	66
3.4.2. El factor Sp2.	67
3.4.3. El factor Sp3: activador vs represor.	67
3.4.4. El factor Sp4: el específico de tejido.	68
3.5. Mecanismos de regulación postranscripcional de Sp1.	69
3.5.1. Fosforilación de Sp1.	69
3.5.2. Defosforilación de Sp1.	70
3.5.3. Glicosilación.	71
4. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).	72
4.1. Introducción general.	72
4.2. Señalización intracelular acoplada al EGFR.	75

4.2.1. Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).	76
4.2.2. Proteínas quinasas C (PKC).	79
OBJETIVOS	83
MATERIAL Y MÉTODOS	87
MATERIALES	89
1. Instrumentación.	89
2. Reactivos y productos químicos.	90
3. Material biológico y modelos celulares.	93
3.1. Animales.	93
3.2. Líneas celulares.	93
MÉTODOS	94
1. Cultivos celulares.	94
1.1. Aislamiento y cultivo de neuronas corticales.	94
1.2. Cultivo de astrocitos corticales.	95
1.3. Cultivo de macrófagos peritoneales	96
1.4. Cultivo de líneas celulares N2a y RAW 264.7.	96
2. Determinación fluorimétrica de la concentración de Ca^{2+} intracelular.	97
2.1. Estudios microfluorimétricos en células individuales.	97
2.2. Determinación de la concentración de Ca^{2+} citosólico en células en suspensión.	99
3. Estudios de expresión génica.	101
3.1. Extracción y control de calidad de las muestras de ARN total.	101
3.2. Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	102
3.3. PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).	103
4. Inmunotransferencia o “Western blot”.	106
4.1. Extracción y cuantificación de proteínas.	106
4.2. Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de las membranas.	107
5. Inmunocitoquímica.	108
6. Inmunohistoquímica.	109
7. Clonaje del promotor del gen <i>P2rx7</i> de ratón y construcción de los plásmidos reporteros de luciferasa.	110
7.1. Extracción del ADN genómico (ADNg).	110
7.2. Clonaje del fragmento en el vector pGEM*.	110
7.3. Clonaje en el vector pGL4.23*.	111
7.4. Mutagénesis dirigida.	112
8. Plásmidos de sobreexpresión y silenciamiento de Sp1.	113
8.1. Vector de sobreexpresión de Sp1.	113
8.2. Vectores de interferencia de Sp1.	114
9. Transfecciones celulares.	116
9.1. Transfección con los plásmidos reporteros de luciferasa.	116
9.2. Transfección con los plásmidos de sobreexpresión y silenciamiento de Sp1.	117

10. Análisis estadístico de los datos.	118
RESULTADOS	119
1. Caracterización del neuroblastoma de ratón Neuro-2a (N2a).	121
1.1. Expresión de receptores P2X en el neuroblastoma N2a.	121
1.2. Caracterización funcional del receptor P2X7 en células N2a.	123
2. Regulación transcripcional del receptor P2X7.	126
2.1. Análisis informático de la región promotora del gen <i>P2rx7</i> .	126
2.2. Análisis funcional de la región promotora del gen <i>P2rx7</i> .	127
2.3. Presencia de sitios SP1 en la región 5' proximal del gen <i>P2rx7</i> .	130
2.4. Análisis filogenético de los sitios SP1.	131
2.5. Análisis funcional de los sitios SP1.	132
2.6. Efecto de la sobreexpresión de Sp1 en la expresión del receptor P2X7 nativo.	135
2.7. Efecto del silenciamiento de Sp1 en la expresión del receptor P2X7 nativo.	136
2.8. Regulación transcripcional del receptor P2X7 en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales.	137
2.9. Distribución del receptor P2X7 y del factor Sp1 en cerebro de ratón.	139
3. Señalización intracelular implicada en la regulación transcripcional del receptor P2X7.	141
3.1. Efecto de la privación de suero en la expresión del receptor P2X7.	143
3.2. Implicación del receptor de EGF en la regulación de la expresión del receptor P2X7.	145
3.3. Implicación de PI3K en la regulación de la expresión del receptor P2X7.	146
3.4. Implicación de Akt en la regulación de la expresión del receptor P2X7.	146
3.5. GSK3 y mTOR no participan en la regulación de la expresión del receptor P2X7.	149
3.6. Implicación de la vía PI3K/Akt en la regulación de la expresión por Sp1.	151
3.7. Regulación negativa de la expresión del receptor P2X7 por PKC.	152
3.8. Implicación de PKCζ en la regulación negativa de la expresión del receptor P2X7.	155
DISCUSIÓN	157
1. Caracterización funcional del receptor P2X7 en el neuroblastoma de ratón Neuro-2a (N2a)	159
2. Regulación transcripcional del receptor P2X7 por Sp1	161
2.1. Caracterización de la región promotora del gen <i>P2rx7</i>	161
2.2. Efecto de Sp1 sobre la expresión del receptor P2X7 nativo	164
3. Estudio de las vías implicadas en la regulación de P2X7.	166
4. Implicaciones patológicas de la vía EGFR/PI3K/Akt/Sp1/P2X7 en neuroblastomas y otras células tumorales.	174
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	183

SUMMARY

Introduction

Purinergic signal transduction mechanisms constitute a complex intra- and intercellular signalling network that plays an important regulatory role in both central (CNS) and peripheral nervous systems. Nucleotides exert their extracellular effects by acting on specific receptors (Burnstock et al., 2011). Availability and half-life of these extracellular nucleotides are governed by ectonucleotidases which sequentially hydrolyze nucleotides to adenosine (Robson et al., 2006; Zimmermann, 2006). There are two types of P2 receptors: ionotropic P2X and metabotropic P2Y receptors (Burnstock and Kennedy, 1985). To date, seven mammalian P2X receptor subtypes (P2X1–7) and eight mammalian P2Y receptor subtypes (P2Y1, 2, 4, 6, 11–14) have been cloned and functionally characterized (Abbracchio et al., 2003; Burnstock et al., 2011; Khakh et al., 2001; von Kugelgen and Harden, 2011). P2X receptors are nonselective cation channels formed by the association of three P2X subunits (Nicke et al., 1998). Each P2X subunit consists of two transmembrane-spanning segments separated by an *N*-glycosylated extracellular loop containing 10 conserved cysteine residues (Clyne et al., 2002; Ennion and Evans, 2002) where the N- and C-termini are intracellular. Purinergic P2X7 receptor belongs to the family of ATP-gated cation channels that mediate a non-selective cation conductance when activated by an appropriate ligand. It is the most divergent member of the P2X family in terms of molecular structure, pharmacology and function (Coddou et al., 2011). The P2X7 receptor forms trimeric complexes of identical subunits in the plasma membrane and is unable to oligomerize with other P2X receptors (Coddou et al., 2011; Torres et al., 1999). Although its structure is basically similar to other P2X receptor subunits, the intracellular carboxy terminal domain of P2X7 receptor is much longer (239 amino acids) (North, 2002).

The distribution and relative abundance of P2X receptors have been studied in different brain areas and cell types (Franke and Illes, 2006). P2X receptor activation results in Na⁺ and Ca²⁺ influx across the cell membrane, which leads to depolarization of the plasma membrane that can, in turn, activate voltage-gated ion channels. Using pharmacological tools and gene knockout/knockdown approaches, it has become clear that P2X receptors are involved in a wide and growing range of physiological processes (Khakh and North, 2006). In the CNS, ATP directly mediates fast excitatory synaptic transmission, acting via P2X receptors in mammalian neurons (Edwards et al., 1992; Evans et al., 1992; Silinsky et al., 1992). Furthermore, presynaptic P2X receptors can modulate neurotransmitter release: ATP enhances glutamate release in the

hippocampus (Khakh et al., 2003; Sperlagh et al., 2002), spinal cord (Nakatsuka et al., 2003), and midbrain (Gualix et al., 2003); 4-aminobutyrate release is facilitated by P2X activation in cultured spinal cord dorsal horn neurons (Jo and Schlichter, 1999), midbrain synaptosomes (Gomez-Villafuertes et al., 2001) and lateral hypothalamic neurons (Jo and Role, 2002); and glycine release is enhanced by ATP from interneurons in the dorsal horn region (Rhee et al., 2000), trigeminal nucleus pars caudalis neurons (Wang et al., 2001) and spinal cord substantia gelatinosa neurons (Jang et al., 2001). Within the P2X family, the P2X7 receptor has a distinguished role in the central nervous system (CNS) for its implication in several physiological tasks such as learning and memory, circadian rhythms, mood and motivation (Burnstock et al., 2011). In the last years the knowledge about the role of P2X7 receptors in the CNS, in terms of intracellular pathways coupled to its activation, has been noticeably improved. Thus, P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons (Leon et al., 2006), being also coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in the same neuronal model (Ortega et al., 2009). Moreover, calcium/calmodulin-dependent kinase II signaling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of axonal growth and branching in hippocampal neurons (Diaz-Hernandez et al., 2008). P2X7 receptors seem to be involved not only in physiological functions but also in a variety of pathological brain processes, where the functional expression level of P2X7 receptor seems to be crucial. This has been highlighted by an increasing number of findings that aberrant or altered receptor expression and function have a causative role in neurodegenerative diseases, mood disorders and neuropathic pain (Burnstock et al., 2011; Diaz-Hernandez et al., 2011; Diaz-Hernandez et al., 2009; Skaper et al., 2010; Tsuda et al., 2010). In addition, P2X7 receptor is highly expressed in a variety of human neuroblastoma cells from either primary tumors or cell lines, and its activation increases the proliferation and growth of the tumors (Di Virgilio et al., 2009; Raffaghello et al., 2006). Altogether, these evidences point to P2X7 receptor as an appealing target for pharmacological intervention.

To understand the physiological and pathological role of P2X receptors in the cell it is important to know how their expression is regulated. However little is known about the transcriptional regulation of P2X receptor expression in the CNS. There is scarce information about the transcriptional regulation of P2X1, P2X2, P2X4 and P2X7 subunits. P2X2 seems to be regulated by retinoic acid compounds. P2X1 and P2X4 lack TATA or CAAT boxes and the involvement of Sp1 transcription factor in their transcriptional regulation has been reported. Curiously, for the human *P2RX7* gene it has been described a regulation by hipermethylation of CpG islands (Korenaga et

al., 2001; Tozaki-Saitoh et al., 2006; Tsai et al., 1994; Zhao and Ennion, 2006; Zhou et al., 2009). Sp1 protein was the first mammalian transcription factor cloned (Kadonaga et al., 1987). Sp1 binds to GC-rich sequences including GC-boxes, CACCC-boxes (also called GT-boxes) and basic transcription elements (collectively termed 'SP1 sites'). Early studies indicated that Sp1 was responsible for recruiting TATA-binding protein and fixing the transcriptional start site at TATA-less promoters. It was also showed that Sp1 was subject to extensive post-translational modification by both glycosylation and phosphorylation (Jackson et al., 1990; Jackson and Tjian, 1988), indicating that its activity was likely to be regulated. It is now clear that the phosphorylation state of Sp1 influences its transcriptional activity. Sp1 is phosphorylated by various kinases at different sites within the protein, and the influence of these modifications on the function of the transcription factor is only beginning to be understood. Kinases regulating Sp1 binding and/or activity include cyclin-dependent kinase (CDK) (Fojas de Borja et al., 2001), atypical protein kinase C- ζ (PKC- ζ) (Kavurma et al., 2001; Rafty and Khachigian, 2001; Tan et al., 2008), PI3K (Bae et al., 2006; Chen et al., 2009), extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Bonello and Khachigian, 2004; Milanini-Mongiat et al., 2002), casein kinase II (CKII) (Armstrong et al., 1997), and DNA-dependent protein kinase (Chun et al., 1998). The role of phosphatases in the maintenance of Sp1 phosphorylation is as important as kinases. Protein phosphatases 1 and 2A (PP1 and PP2A) are major Ser/Thr phosphatases in eukaryotic cells. Their role in the regulation of Sp1 phosphorylation has been convincingly demonstrated. Okadaic acid (OA) is an efficient inhibitor of PP1 and PP2A. Several groups have found that OA increases the level of Sp1 phosphorylation (Armstrong et al., 1997; Chu et al., 2003; Chun et al., 1998), suggesting that the steady state levels of Sp1 phosphorylation are suppressed by the protein phosphatases. On the other hand, a myriad of nuclear and cytoplasmic proteins in eukaryotes are dynamically glycosylated at multiple sites by single O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) moieties (Hart, 1997). The O-glycosylation of Sp1 by N-acetylglucosamine has been linked to multiple changes in its function, including altered self-association, altered interaction with basal transcription factors (Roos et al., 1997), and modulation of its degradation (Han and Kudlow, 1997). Interestingly, since increased glycosylation of Sp1 following treatment of cells with an acetylglucosaminidase inhibitor leads to a decrease in its phosphorylation, it has been proposed that regulation of Sp1 activity by glycosylation and phosphorylation may be coordinated (Haltiwanger et al., 1998).

Sp1 belongs to a family of transcription factors containing at least twenty identified members in mammals. The family includes Sp proteins (Sp1, Sp2, Sp3, Sp4), and Krüppel-like factors (KLFs). The diversity of this family is further increased

by transcriptional and post-transcriptional mechanisms, such as alternate splicing, promoter usage, or initiation codon usage (Kennett et al., 1997; Takahara et al., 2000). As might be expected from this diversity, the family members also differ in their transcriptional activity, with some being activators and other repressors. To function as site-specific transcription factors, proteins require at least three domains: a DNA-binding domain, a nuclear localization signal, and a transcriptional regulatory domain. The defining feature of Sp1-like/KLF proteins is a highly conserved DNA-binding domain (more than 65% sequence identity among family members) at the carboxyl terminus that has three tandem Cys₂His₂ zinc-finger motifs. In addition to DNA binding, the zinc-finger motifs may also function in protein-protein interactions that modulate DNA-binding specificity (Song et al., 2002b; Zhang et al., 2001). The amino-terminal regions of the Sp1-like/KLF proteins are much more variable and contain transcriptional activation or repression domains. In addition, Sp1-like/KLF proteins have nuclear localization sequences, which can occur immediately adjacent to, or within, the zinc-finger motifs (Shields and Yang, 1997; Song et al., 2002a).

‘SP1 sites’ have been found to be involved in tissue-specific gene expression and in the control of transcription following different stimuli (e.g., in response to oncogenes, antimetabolites, growth stimulation and differentiation), demonstrating that ‘SP1 site’-dependent transcription can be highly regulated in cells. Expression and gene-knockout studies are beginning to reveal that most, if not all, Sp1-like/KLF proteins are involved in growth-regulatory or developmental processes of a large number of tissues. Sp1, for instance, is ubiquitously expressed in murine cells, and the knockout of this gene leads to gross global morphological defects very early in development (Black et al., 2001; Marin et al., 1997). Because many Sp1-like/KLF proteins regulate cell growth in a variety of cell types, it is not surprising that some members of the family also appear to participate in mechanisms leading to carcinogenesis. Several members of the Sp1-like/KLF family can regulate transcription by interacting with co-repressors or co-activators. Recent evidence suggests that histone acetylation and deacetylation, which are associated with repression and activation of transcription, respectively, may serve as a switch for Sp1-like/KLF proteins to function as activators or repressors.

Cell surface molecules communicate information from the extracellular medium to the cell. This sensing is critical in multicellular organisms as cells must function appropriately to their localization and respond in concert to the needs of the organism. One major family of sensors is comprised of transmembrane receptors with intrinsic tyrosine kinase activity (RTK). The prototypal member of this family is the EGF receptor

(EGFR), as it was the first receptor described to possess tyrosine kinase activity and the first member of this superfamily to be sequenced. Co-incidentally, the structure of EGFR appears to represent an archetypal pattern for this superfamily of extracellular sensors that control basic cell functions. EGFR-dependent signal transduction begins with the stabilization of a receptor dimer through ligand binding (Moghal and Sternberg, 1999). These receptors present kinase activity directed against tyrosine residues located both within the receptor itself (autophosphorylation) and on target downstream molecules. EGFR is a pleiotropic signaler. The integrated biological response to EGFR activation varies from mitogenesis to apoptosis, migration to differentiation to dedifferentiation even in the same cell depending on the context, which includes cell density, type of matrix, other cytokines, and even the position within a cell colony (Wells et al., 1998). EGFR kinase activity triggers numerous downstream signaling pathways similar to other RTK and tyrosine kinase-linked cytokine receptors. These pathways include those that involve PLC γ (phospholipase C- γ) and its downstream calcium- and PKC-mediated cascades, ras activation leading to various MAP kinases, other small GTPases such as rho and rac, multiple STAT (signal transducer and activator of transcription) isoforms, and heterotrimeric G proteins, as well as others including the phospholipid-directed enzymes phosphatidylinositol 3'-OH kinase (PI3K) and phospholipase (PLD) (Wells, 1999). Temporal and spatial control of EGFR signaling dictates the biological outcome possibly by altering the balance between various signaling pathways. Many signaling pathways contribute to multiple responses; activation of ERK MAP kinase promotes both proliferation and migration (Xie et al., 1998). Also PI3K, which adds a phosphate group to the PIP2 forming the second messenger PIP3, was early known to be a candidate effector of the EGFR (Wells, 1999).

PI3Ks are heterodimeric proteins, consisting on a catalytic subunit of 110 kDa (p110) and an associated regulatory subunit (p85). The regulatory subunits do not possess any known enzymatic activity but are composed of several domains with homology to those found in other signaling proteins. These domains are termed modular because they can be separated functionally and spatially from the rest of the protein in which they reside. Most p85 subunits contain an N-terminal src-homology 3 (SH3) domain, two or three proline-rich segments, a region of homology to GTPase-activating proteins for the rho family of small G proteins (rho-GAPs), and two src-homology 2 (SH2) domains (Fruman et al., 1998). Signaling proteins containing pleckstrin-homology (PH) domains accumulate at sites of PI3K activation by directly binding to PIP3. Of particular interest are the protein serine-threonine kinases Akt and phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1). Association with PIP3 at the membrane

brings these proteins into proximity and facilitates phosphorylation of Akt by PDK1 (Lawlor and Alessi, 2001). This phosphorylation stimulates the catalytic activity of Akt, resulting in the phosphorylation of a host of other proteins that affect cell growth, cell cycle entry, and cell survival. But Akt is not the only protein phosphorylated by PDK-1. This kinase PDK1 phosphorylates and activates other protein kinases, including p70 S6-kinase, cytokine- independent survival kinase (CISK), and protein kinase C ζ (PKC ζ) (Cantley, 2002).

A prototype of the protein kinase C (PKC) family of serine/ threonine kinases was first described by Nishizuka and coworkers (Takai et al., 1979), who initially discovered that PKC is activated by diacylglycerol (DAG). At the moment, up to 12 distinct family members have been discovered in mammalian cells. Protein kinase C comprises a family of serine/threonine protein kinases which play a critical role in many signal-transducing pathways in the cell. All PKC family members share a structural backbone, mainly consisting of a regulatory domain at the N-terminus and a catalytic domain at the C-terminus. The PKC isoforms can be divided into three major groups based on their structural characteristics and cofactor requirements. These include the classical PKC (α , β I, β II, and γ), novel PKC (δ , ϵ , η and θ) and the atypical PKC (ζ and λ /I) isoforms (Azzi et al., 1992; Kikkawa et al., 1989; Svetek et al., 1995). All family members require phosphatidylserine, a component of the phospholipid bilayer, for their activation. Classical PKCs are calcium (Ca^{2+}) sensitive and need in addition DAG or phorbol esters for activation. The novel PKCs are Ca^{2+} independent but still require DAG or phorbol esters (Kazanietz et al., 1993). For the atypical PKCs, being also Ca^{2+} independent, phosphatidylserine is sufficient to induce their maximal activity (Chauhan et al., 1990). PKC has been implicated in a multitude of physiological functions in the cell, and considerable evidence exists which suggests that PKC plays a fundamental role in signaling mechanisms leading to mitogenesis and proliferation of cells, apoptosis, platelet activation, remodeling of the actin cytoskeleton, modulation of ion channels and secretion. PKCs can be considered as classical mediators of many extracellular agonists which elicit the production of multiple lipid second messengers. PKC isozymes are homologous enzymes in which the functional specificity is determined by their subcellular localization. After activation, each isozyme is translocated to a unique subcellular site where it is anchored by specific proteins, collectively termed RACKs (Mochly-Rosen, 1995). Recent studies suggest that PKC are involved in cell survival regulation (Barr et al., 1997; Berra et al., 1997; Murray and Fields, 1997; Whelan and Parker, 1998). The identification of both pro- and antiapoptotic isoforms suggests that PKC may function as a molecular sensor, promoting cell survival under favorable

conditions and executing the death of abnormal or damaged cells (Dempsey et al., 2000; Lucas and Sanchez-Margalet, 1995).

Objectives

P2X7 receptor is present in a wide variety of normal and disease-associated cell types. Within the P2X family, the P2X7 receptor has a distinguished role in the central nervous system (CNS) for its implication in several biological tasks such as learning and memory, circadian rhythms, mood, and motivation (Burnstock et al., 2011). P2X7 receptors seem to be involved not only in physiological functions but also in a variety of pathological brain processes, where the expression level of functional P2X7 receptor seems to be crucial (Di Virgilio et al., 2009; Raffaghello et al., 2006; von Kugelgen and Wetter, 2000). Altogether, these evidences point to P2X7 receptor as an appealing target for pharmacological intervention; however, little is known about the transcriptional regulation of P2X7 receptor expression in the CNS. Based on this background, in this doctoral thesis we wanted to deepen the P2X7 expression regulation mechanism. For that study we outlined the following objectives:

1. To characterize an optimal cellular model of neural origin, easy to obtain, to manipulate and to maintain, which present a high transfection efficiency to carry on molecular assays. It was a requirement that this cell line expressed a native and functional P2X7 receptor.
2. To characterize in depth the minimal promoter region required for inducing the murine *P2rx7* gene basal expression, as well as to identify the transcriptional factor or factors responsible for the gene expression.
3. To analyze the effect of the transcriptional factor previously described on the native P2X7 receptor transcriptional regulation.
4. To characterize the intracellular signaling pathways that are involved in the P2X7 receptor transcriptional regulation and to analyze the role of the identified transcription factor in that signaling.

Results and discussion

The limited biological material and the cellular heterogeneity of primary neuronal cultures frequently represent a disadvantage in the unequivocal characterization of signaling pathways and molecular cascades. For this reason, clonal neuroblastoma cell lines are commonly used as models to study neuronal differentiation, as they retain

the capacity to differentiate into a neuronal-like phenotype, whilst expressing a rich repertoire of membrane receptors coupled to the most well-known second messenger systems. Purinergic receptors have been shown to be widely distributed throughout the nervous system, being present in both neurons and glial cells. It is well known that activation of P2X receptors by ATP is implicated in fast excitatory neurotransmission, presynaptic regulation of neurotransmitter release, cell proliferation, axonal growth and development, and also in disease and cytotoxicity (Diaz-Hernandez et al., 2008; Jia et al., 2007; Ortega et al., 2009; Pankratov et al., 2009; Sperlagh et al., 2007; Sperlagh et al., 2006; Tapias et al., 2004).

In order to investigate the presence of native purinergic receptors in N2a cells, the expression of mouse P2X subunits was analyzed at both transcriptional and protein level. RT-PCR experiments demonstrated that most P2X subunits are expressed in N2a cells. To characterize the relative amount of each P2X transcript, quantitative real-time PCR (Q-PCR) assays were performed. Four main P2X mRNAs coding for P2X1, P2X3, P2X4 and P2X7 subunits were found in this cell line, with P2X1 and P2X4 transcripts being the most abundant. The expression of P2X2, P2X5 and P2X6 was practically undetectable. Western blot analyses were performed on total protein extracts obtained from N2a cells using commercial subunit-specific antibodies. In this study, the bands obtained for P2X1 (59 kDa), P2X3 (64 kDa), P2X5 (63 kDa) and P2X7 (78 kDa) subunits are consistent with the molecular masses reported for the glycosylated monomers (Bo et al., 2003; Nicke et al., 1998; Roberts et al., 2006a; Roberts et al., 2006b; Vulchanova et al., 1997). The low-molecular-mass bands observed for P2X1 (48 kDa) and P2X4 (42 kDa) subunits probably represent unglycosylated proteins (Nicke et al., 1998; Soto et al., 1996). A small band detected at 45 kDa with the P2X7 antibody may correspond to a truncated splice variant of the P2X7 receptor, as described in humans (Cheewatrakoolpong et al., 2005). The functionality of P2X7 receptors in N2a cells was defined pharmacologically. Currently, no specific agonists or antagonists exist for all of the P2X receptors, and therefore their pharmacological identification relies on the effects of a number of compounds (for a review, see (Coddou et al., 2011; Jarvis and Khakh, 2009)). ATP 100 μ M and BzATP 100 μ M were able to induce an increase in $[Ca^{2+}]_i$, whereas α,β -meATP and CTP were ineffective. The potency for BzATP was increased by two-fold following the omission of Mg^{2+} from the extracellular medium, suggesting that ATP^{4-} is the active ligand. Likewise, the fact that an increase in $[Ca^{2+}]_i$ could not be evoked by α,β -meATP 100 μ M nor CTP 300 μ M, clearly demonstrated that, if present, P2X1, P2X3 and P2X4 receptors are not functionally prominent in N2a cells (Evans, 1996; Soto et al., 1996). In contrast, both the substantial increase in $[Ca^{2+}]_i$

and the small ionic current evoked by micromolar concentrations of ATP indicate that, in this cell model, the response to micromolar ATP concentration is mainly mediated by metabotropic P2Y receptor activation, as reported previously (Lakshmi and Joshi, 2006). The P2X7 receptor antagonists KN62 50 nM, BBG 1 μ M and A438079 1 μ M inhibited BzATP-evoked calcium responses elicited by 100 μ M BzATP by $66.2 \pm 5.9\%$, $75.7 \pm 2.3\%$ and $71.7 \pm 13.0\%$ respectively, thus demonstrating the presence of P2X7 receptors (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007; Jiang et al., 2000; Romagnoli et al., 2008). Interestingly, both KN62 and BBG behaved as slowly reversible antagonists, whereas the inhibitory effect of A438079 was rapidly reversed. These data point to the existence of native functional P2X7 receptors in N2a cells. In this study, we characterized the presence of P2X7 receptors by molecular, immunocytochemical, pharmacological and biophysical techniques in nondifferentiated murine N2a neuroblastoma cells.

As previously mentioned, within the P2X family, the P2X7 receptor has a distinguished role in the central nervous system for its implication in both normal behaviour and pathological brain functions including neurodegenerative diseases and neuropsychiatric disorders (Burnstock et al., 2011). Moreover, high P2X7 expression in most human neuroblastoma so far investigated seems to be related with malignant cell growth and progression (Di Virgilio et al., 2009; Raffaghello et al., 2006; Sun, 2010). All these evidences point to P2X7 receptor as a relevant pharmacological target for the treatment of both neurodegenerative disorders and cancer, making necessary to deep in the mechanisms involved in the regulation of P2X7 receptor expression. Thus we aim to study the murine *P2rx7* gene promoter in order to elucidate putative factors involved in its regulation. Previous studies located the active promoter of the human *P2RX7* gene in the -158/+32 nt region surrounding the transcription start site (TSS), although the transcription factors involved in the promoter activity were unknown (Buell et al., 1998; Zhou et al., 2009). To characterize the molecular mechanisms that control P2X7 expression, we cloned and characterized 2334 bp of the 5'-flanking region of the murine *P2rx7* gene (from -2114 to +220). Bioinformatics analysis showed that the *P2rx7* gene promoter, like most eukaryotic gene promoters, does not contain TATA or CAAT boxes. It is well established that genes lacking a typical TATA box in their promoter sequence depend on multiple upstream regulator sequences for their activation (Azizkhan et al., 1993). Software analysis of putative transcription factor binding indicated that the 5'-proximal regulatory region of the murine *P2rx7* gene suggests that P2X7 expression is tightly regulated at the transcriptional level as it contains several putative regulatory elements including AP1, CREB, E-box, HIF, SP1, STAT, TCF/LEF1, and YY1F. The most striking feature revealed by the *in silico* analysis

of *P2rx7* promoter is the presence of seven putative SP1 motifs, most of them being located close to the TSS. All of these sites have a very high similarity with the theoretical matrix (score >0.85) and are located in both strands: forward strand (sites -1457/-1441, -281/-265, -155/-139, -150/-134, and -79/-63 bp) and reverse strand (-1/+16 and +131/+147 bp). The Sp1 family of transcription factors recognizes GC and GT boxes at the DNA and has been widely described as general transcription factors frequently involved in transcriptional regulation of gene promoters that lack consensus TATA and CAAT boxes (Suske et al., 2005). It is well established that DNA methylation of CpG islands is an important mechanism for transcriptional regulation of multiple genes in mammals (Bird, 1986; Larsen et al., 1992; Siegfried et al., 1999). Methylation degree of CpG islands contained within the SP1 consensus elements may interfere with the binding of Sp1 to DNA, modulating the Sp1-dependent transcription of genes (Clark et al., 1997). Bioinformatic analysis revealed that the 5'-proximal regulatory region of the murine *P2rx7* gene lacks CpG islands, so we ruled out that methylation of SP1 sites located into the promoter region could be interfering Sp1 binding to DNA. However, we cannot discard an epigenetic control of *P2rx7* gene since frequently CpG regions outside the active promoter can regulate transcription by modulation of DNA methylation. Indeed, the presence of a CpG rich 547 bp region downstream of the active promoter of the human *P2RX7* gene that regulates its transcription has been previously reported (Zhou et al., 2009).

To study the transcriptional activity of the *P2rx7* promoter fragment, sequential deletions of the 5'-flanking region from -2114 to +220 bp of the *P2rx7* proximal promoter were amplified by PCR and subcloned into the luciferase reporter vector pGL4.23 to build 6 different constructs. Transfection experiments using different 5'-flanking sequences linked to the luciferase gene showed that 266 bp of the mouse *P2rx7* gene (from -249 to +17) contain the minimal promoter region. This fragment comprises the TSS and four putative SP1 sites (named SP1a, b, c, and d, respectively). By deletion analysis, this region of maximum promoter activity could be subdivided into three segments, F1 (-249 to -139) with the same activity than the empty vector, F2 (-148 to -41 bp) that increased promoter efficiency 3-fold compared to complete F fragment 9.56 ± 1.16 and 2.98 ± 0.24 , respectively, and a proximal segment F3 (-50 to +49 bp) that displayed a significant promoter activity similar to that exerted by complete F construct 3.55 ± 0.39 and 2.98 ± 0.24 respectively. These findings indicate that the major elements responsible for transcriptional activation must be confined to these regions. Interestingly, both F2 and F3 constructs contains putative SP1 sites (SP1c and SP1d, respectively) that are structurally identical to the consensus site G/T-

GGGCGG-G/A-G/A-C/T (Tan and Khachigian, 2009), although SP1d is located in the reverse strand.

We investigated whether SP1 binding sites identified in the murine promoter were also present in the upstream sequence of P2X7 genes from other mammals, since relevant transcriptional regulatory elements often show conservation between species (Liu et al., 2004). The species analyzed included rat, macaque, chimpanzee, orangutan and human. Sequence alignment showed conserved SP1c and SP1d sites in identical positions across all species examined, suggesting that the involvement of Sp factors in the regulation of P2X7 transcription has been conserved during evolution. It is to notice that P2X7 receptor gene is highly polymorphic, with 40 coding variants reported in humans and more than 12 non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) characterized for their effect on function (Jorgensen et al., 2012). At least 8 SNPs in *P2RX7* confer loss-of-function in the P2X7 signalling pathway, giving rise to severe functional defects (Fuller et al., 2009; Gu et al., 2004). Only two variants have been shown to confer gain of function (Stokes et al., 2010). Currently, 5 SNPs has also been identified in the *P2RX7* promoter, although none of them appears to be associated with an altered ATP response phenotype (Li et al., 2002b). However, support for a regulatory role for the promoter SNPs comes from the fact that a positive association between a *P2RX7* promoter polymorphism (-762, T/C) and a major susceptibility to tuberculosis has been reported (Li et al., 2002a). Based on this precedent, we speculate that the presence of promoter SNPs in the region containing SP1c and/or SP1d could alter binding of Sp1 transcription factor resulting in a decrease in P2X7 receptor gene transcription.

Currently Sp1 family of transcription factors consists of nine proteins (Sp1-9), being Sp1 the first member identified and cloned (Suske et al., 2005). Although Sp3 was found to be highly homologous to Sp1 with similar affinities for GC/GT boxes, there are some striking functional differences. Sp3 has been shown to act as a transcriptional activator in some cellular contexts, whereas in other experimental conditions Sp3 remains inactive or represses transcription driven by Sp1 or other transcription factors (Bouwman and Philipsen, 2002). Given the dual nature of Sp3, our experiments were focused on Sp1 protein as the classical transcriptional activator of GC boxes-containing genes.

To confirm the involvement of SP1c and SP1d binding sites in the regulation of *P2rx7* promoter, we performed reporter luciferase experiments with pP2X7-F2 and

pP2X7-F3 promoter constructs bearing a double point mutation at each of the two SP1 cores. The mutations completely blocked the promoter activity observed in non-mutated constructs, indicating that both SP1 sites are actively regulating *P2rx7* gene expression. We explored whether the regulation of *P2rx7* gene expression by Sp1 is limited to neuronal cells and performed analogous experiments in immune cells that natively express high levels of P2X7 receptors. Thus the macrophage RAW264.7 cell line was transfected with the wild type and mutant constructs and luciferase assays were performed. As expected, mutation of Sp1 cores completely blocked the promoter activity observed in non-mutated constructs. Altogether these results demonstrate that the regulation of P2X7 expression by Sp1 is not tissue-restricted.

Over-expression of Sp1 protein for 48 h increased gene promoter activity in N2a cells since luciferase activity was noticeably enhanced in cells transfected with Sp1 vector by 2-fold. As expected, SP1c and SP1d mutations were able to disrupted Sp1-enhanced promoter activity, suggesting that Sp1 binds to SP1c and SP1d sites to positively regulate *P2rx7* gene expression. To investigate whether Sp1 plays a relevant role in the transcriptional regulation of endogenous *P2rx7* gene, N2a cells were transiently transfected with Sp1 expression plasmid (Sp1-GFP) or empty vector (GFP) and with two specific Sp1-shRNA or scrambled vectors. Both mRNA and protein levels were quantified 48 h and 72 h after transfection, respectively. Q-PCR studies and western blot analysis revealed that the endogenous levels of both Sp1 and P2X7 transcripts and protein levels were significantly increased in Sp1 over-expressing cells. On the other hand, Sp1 interference significantly reduced both the transcript and the protein levels of Sp1 and P2X7 receptor showing that Sp1 acts as a key factor necessary for the basal activation of *P2rx7* gene transcription. Several studies have established the ability of 'Sp1 sites' to mediate growth induction of a variety of promoters, including those of the genes encoding insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 2 (Kutoh et al., 1999), vascular/endothelial growth factor (VEGF) (Milanini et al., 1998), thymidine kinase (Sorensen and Wintersberger, 1999), and serum response factor (Spencer and Misra, 1999). Interestingly, studies have indicated that, depending on the promoter, upregulation of 'Sp1 site'-dependent transcription can be related to positive or negative changes in cell growth. This dual role is consistent with the presence of essential 'Sp1sites' in both growth-promoting and differentiation dependent genes and shows that the response of 'Sp1sites' to a particular stimulus can be promoter- and context-dependent.

Mithramycin A is an antibiotic isolated from various strains of the bacterium

Streptomyces that has been used in combination with other drugs such as apoptosis-inducing agents, chemotherapeutic drugs, or antiangiogenic compounds as a novel therapy for pancreatic cancer and other tumors (Jia et al., 2007). The mechanism of action of mithramycin involves a non-covalently binding to GC-rich DNA sequences, preventing Sp1 from binding to a variety of promoters of genes involved in cell death, cell migration and immune recognition of tumor cells (Koller and Miller, 1986). Here, we showed that neuroblastoma and macrophage cell lines and primary cultures of cortical neurons and astrocytes treated with mithramycin A 300 nM for 24 h underwent a reduction in endogenous P2X7 mRNA and protein levels indicating that Sp1 regulates P2X7 expression in these cells. Noteworthy high levels of P2X7 receptor expression have been found in various cancer cells, including human primary neuroblastoma tumors and neuroblastoma cell lines where P2X7 receptors support tumor growth (Adinolfi et al., 2012; Raffaghello et al., 2006; Sun, 2010). Although the source of extracellular ATP required to keep a tonic P2X7 receptor activation remains unclear, the exocytotic release of ATP coupled to P2X7 receptor stimulation has been demonstrated in neuroblastoma cells (Gutierrez-Martin et al., 2011). In addition, a growing number of studies suggest a noticeable convergence between genes involved in transformation and those necessary for some types of neurodegeneration. In this line, mithramycin has been reported to prolong survival in mice models of Huntington's disease (Chatterjee et al., 2001; Ferrante et al., 2004; Qiu et al., 2006; Ryu et al., 2006; Stack et al., 2007), and to protect against dopaminergic neurotoxicity after methamphetamine administration (Hagiwara et al., 2009). In addition, mutant huntingtin has been reported to inhibit Sp1-mediated gene transcription (Dunah et al., 2002; Li et al., 2002c), and human *Huntingtin* gene expression is transcriptionally regulated by Sp1 (Wang et al., 2012). To determine whether Sp1 is also able to regulate *P2rx7* gene expression *in vivo*, we analysed the distribution of Sp1 and P2X7 receptor in the brain of newborn (P0) mice. To perform this study we used *P2rx7*-EGFP transgenic mice that express EGFP under the control of *P2rx7* promoter (Gong et al., 2003). To validate the reliability of the *P2rx7*-EGFP reporter mice, we analysed the expression of EGFP in spleen and peritoneal macrophages, where is natively expressed the P2X7 receptor, and both showed high levels of EGFP in 10 weeks-old mice. CD11 was used as protein marker of macrophages. Immunohistochemical studies using antibodies against Sp1 protein showed that basal levels of Sp1 were widely expressed in the cortex, although some cells showed a higher Sp1 expression compared to the neighboring ones. It is to notice that $76.09 \pm 6.74\%$ (n=68 cells) of EGFP-positive cells also showed a strong Sp1-positive immunostaining. This was confirmed in the brain pons which was enriched in EGFP-positive. Interestingly,

62.81 ± 9.45% (n=143 cells) of EGFP-positive cells colocalized with Sp1-positive cells in this brain region confirming that cells expressing P2X7 receptor also contain a high amount of Sp1 factor. Our analysis of the expression of the P2X7 receptor in newborn *P2rx7*-EGFP mice, where the brain cytoarchitecture is still in progress, showed a good correlation between the presence of P2X7 receptors and the cellular content in Sp1 factor. This data is in agreement with previous studies reporting that Sp1 is essential for early embryonic development (Marin et al., 1997), and that the level of Sp1 rises during development in the neural tissue of early foetuses (Saffer et al., 1991).. These evidences point to Sp1 as an important regulator of cellular processes during brain development and differentiation. Once Sp1 has been identified as a mediator in the transcriptional regulation of P2X7 receptors, we wanted to establish the signalling pathways that could regulate the expression and whether they act modulating Sp1 activity. We based on several studies that connect the serum starvation with an increase in the Sp1-induced genic expression and the activation of different pathways.

Serum deprivation has been described to enhance open chromatin accessibility, facilitating exposure of SP1 binding sites (Pan et al.). Furthermore, Sp1 binding to its regulatory SP1 sites acts as a docking partner for recruiting RNA polymerase II to the promoter, which in turn results in upregulation of gene expression. According to this premise, an increase in P2X7 expression following serum withdrawal could be correlated with an increase in Sp1 binding to SP1 sites at the *P2rx7* promoter. To confirm this hypothesis, we analysed both P2X7 and Sp1 levels in differentiated *versus* proliferated N2a cells. 24 and 48 h serum deprivation resulted in a significant increase in Sp1 mRNA (140,9 ± 12,96 and 193,3 ± 22,06 for 24 and 48 h) followed by an expected increase in the transcript levels of P2X7 receptor (155 ± 10,42 and 275,9 ± 19,99 or 24 and 48 h respectively). Both increases were completely abolished 48 h later in presence of mithramycin A returning P2X7 levels to 130,7 ± 15,69, indicating that both *Sp1* and *P2rx7* genes are being transcriptionally upregulated by Sp1 binding to their promoters. It is to notice that the Sp1 and P2X7 proteins are enhanced under serum deprivation, but the increments observed were not synchronized. This evidence could be relevant to explain why in newborn *P2rx7*-EGFP mice brains some EGFP-positive cells are not simultaneously expressing high levels of Sp1 protein.

Next, we tried to clarify the putative signalling pathways involved in the transcriptional regulation of P2X7 receptor. Cultured cells are frequently grown in medium containing fetal bovine serum that contains growth factors which will facilitate survival and proliferation of cells *in vitro*. However, serum also contains lipoproteins

which serve as scaffolds for RTKs and other signalling proteins. Disruption of rafts by cholesterol depletion (caused by serum starvation) might either inhibit or trigger RTK signalling. The latter is the case for the EGF receptor as disruption of rafts leads to catalytic auto-activation and ligand-independent activation of the receptor (Chen and Resh, 2002; Furuchi and Anderson, 1998; Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002; Westover et al., 2003). It has been described that serum withdrawal induced an increased in activated Akt through PI3K pathway (Evangelopoulos et al., 2005). To examine the involvement of EGFR in the P2X7 receptor increase, N2a cells were cultured without serum in presence or absence of AG1478 1 μ M for 24 and 48 h. EGFR inhibition blocks the effect elicited by serum starvation, indicating that EGFR auto-activation is responsible for P2X7 receptor increase. In many tumors EGFR levels are not overexpressed but rather signalling is upregulated due to autocrine stimulatory loops (Wells, 1999). Focusing on neural cells, it has been described that 10 of 13 neuroblastoma cell lines and all human primary tumors tested expressed *EGFR* at readily detectable levels and that the addition of exogenous EGF led to cell proliferation (Ho et al., 2005).

One of the best characterized effectors of EGFR is MAPK MEK1/2-Erk 1/2 (Moghal and Sternberg, 1999). In order to clarify the involvement of this pathway N2a cells were incubated for 24 h with the inhibitor U0126 10 μ M with no changes observed in the P2X7 transcript level. As the PI3K/Akt pathway is thoroughly described to be downstream EGFR (Burgering and Coffey, 1995; Muthuswamy et al., 1999) we depth in the study of that pathway. Our experiments showed that the treatment of N2a cells with PI3K and Akt inhibitors (LY29004 50 μ M and API-1 10 μ M, respectively) for 24 h blocked the serum starvation-induced P2X7 transcript ($46,31 \pm 3,22$ and $4,391 \pm 0,99$ respectively) and protein increase ($67,05 \pm 5$ and $58,74 \pm 15,24$ respectively). These data correlated well with our former observations where it was detected an increase in phosphorylated Akt level in the absence of serum. Once demonstrated that Akt plays a role in the expression regulation of P2X7 receptor we wanted to analyze its best known effectors: GSK3 and mTOR (Bhaskar and Hay, 2007; Cross et al., 1995; van Weeren et al., 1998). Neither the overexpression of wild type or constitutive active GSK3 nor the treatment with an mTOR inhibitor (rapamycin 2,5 nM) modified the P2X7 expression, ruling out the involvement of these proteins in the transcriptional regulation of P2X7 receptor.

Since transcriptional regulation of P2X7 seems to be GSK3 and mTOR independent, we considered that Akt could be directly phosphorylating Sp1. In fact, several works

describe a relationship between PI3K/Akt pathway and Sp1 phosphorylation increase (Bae et al., 2006; Chen et al., 2009; Pore et al., 2004). To address this issue, Sp1 levels were analyzed in N2a cells incubated with PI3K and Akt inhibitors for 24 h. LY29004 50 μ M and API-1 10 μ M significantly diminished Sp1 levels both at mRNA and protein levels in agreement with the data observed for P2X7 receptor. We also checked nuclear extracts from treated cells where the decreased in the Sp1 protein level was confirmed. These results suggest that PI3K/Akt pathway activation increases Sp1 transcriptional activity, which in turn induces an increase in the expression of Sp1 and its target genes as *P2rx7*.

Signaling proteins with pleckstrin-homology (PH) domains accumulate at sites of PI3K activation by directly binding to PIP3. Apart from Akt, there are many other proteins recruited to the plasma membrane including phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). Association with PIP3 at the membrane brings these proteins into proximity and facilitates phosphorylation of Akt by PDK-1 (Lawlor and Alessi, 2001). But PDK-1 has other interesting substrates besides Akt. The discovery of the PDK-1 as the upstream kinase for protein kinase C (PKC) represented an important step in the understanding of the PKC regulation. Three laboratories simultaneously described PDK-1 as the activation loop upstream kinase for conventional PKC α and PKC β II (Dutil et al., 1998), novel PKC δ and PKC ϵ (Le Good et al., 1998), and atypical PKC ζ (Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998) isoenzymes. Taking into account that serum withdrawal triggers PI3K/Akt pathway, we wanted to figure out whether PKC was involved in P2X7 expression regulation. Thus, N2a cells were incubated with GF109203X, a general PKC inhibitor when used at 5 μ M, and P2X7 mRNA and protein were analyzed 24 h later. We observed a two fold increase for mRNA and 67% for protein showing that PKC is negatively regulating the receptor expression. We carried out immunocytochemistry assays that confirmed a 63% increase in P2X7 protein after the GF109203X treatment. To discover the PKC subtype involved and taking advantage of the requirements of each subtype we performed 24 h treatments with GF109203X 1 μ M (at low concentration it is selective for conventional PKC) or PDBu 200 nM (which is a DAG analogue that activates conventional and novel PKC). In both cases P2X7 mRNA and protein levels were not affected, discarding the participation of conventional and novel PKC in the regulation of P2X7 receptor expression. We also treated N2a cells with a PLC inhibitor avoiding DAG and IP₃ production. This compound had no effect in the P2X7 mRNA level, confirming the involvement of an atypical PKC in the negative regulation of P2X7 receptor expression. Up to now only two atypical PKC subtypes have been discovered, PKC λ/ι and PKC ζ . PKC ι is the human equivalent for murine PKC λ and, although they

show a 72% identity with PKC ζ , they are not functionally redundant and show a different expression pattern (Kovac et al., 2007). Several evidences point out that PKC ζ is able to phosphorylate Sp1, positively or negatively regulating its transcriptional activity (Kavurma et al., 2001; Rafty and Khachigian, 2001; Tan et al., 2008; Zhang et al., 2006). In addition it has been described that PI3K activation induces PKC ζ translocation to the nucleus (Calcerrada et al., 2002; Neri et al., 1999). Based on these data it seems that PKC ζ could be the atypical PKC involved in P2X7 regulation. To address this hypothesis, we performed a time-course experiment in N2a cells cultured in the absence of serum to analyze phosphorylated PKC ζ levels. Serum starvation evoked a fast and transitory increase in Thr410 phosphorylation reaching the maximum after 15 min. Next, to check if the increase in the P2X7 receptor expression elicited by GF109203X 5 μ M was mediated by Sp1 binding to the *P2xr7* promoter, N2a cells were pretreated for 1 h with mithramycin 300 nM and then GF109203X was added. After 48 h we observed that mithramycin blocked the increase in P2X7 mRNA levels induced by GF109203X. Additionally nuclear Sp1 level was highly increased after 24 h treatment with the PKC inhibitor, suggesting that serum withdrawal facilitates PKC ζ activation which, in turn, negatively regulates *P2xr7* gene expression through a Sp1 dependent mechanism.

However, we don't know the mechanism involved in P2X7 receptor regulation through PKC ζ . Supported by the published data, we considered two possible hypotheses. First, as previously mentioned, PKC ζ can phosphorylate Sp1 regulating its transcriptional activity. Although most of the papers describe a positive role for PKC ζ where Sp1 phosphorylation induced and increase in Sp1 dependent transcription there are some works that establish a negative regulation of Sp1 by PKC ζ (Neid et al., 2004; Pivoriunas et al., 2007). On the other hand, it has been described that activated PKC ζ can interact with Akt, sequestering it and avoiding the phosphorylation of Akt target proteins (Bourbon et al., 2002; Breitkreutz et al., 2007; Doornbos, 1999). The use of kinase-inactive mutants of both kinases revealed that dissociation of the complex depends upon Akt activity. Expression of a kinase-dead PKC ζ mutant showed an increased induction of Akt activity indicating that PKC ζ is able to inhibit Akt activity. In contrast, Akt activity was increased more than 7-fold when the cells were co-transfected with the kinase-dead mutant of PKC. Besides, we ignore the pathway involved in PKC ζ activation in N2a cells. There are again two possibilities. On one hand it has been described that PDK-1 would phosphorylate PKC ζ 's activation loop (Thr 410) (Bandyopadhyay et al., 2004; Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998; Messerschmidt et al., 2005; Toker, 1998). On the other hand, it has been reported that ceramides can interact with PKC ζ activating this kinase in a PI3K-independent manner. Ceramides are

produced by cells that suffer cellular stress such as cytokines, UV light, oxidative stress (Spiegel et al., 1996) or serum withdrawal (Albi et al., 2006; Colombaioni et al., 2002).

In conclusion, the regulation of P2X7 receptor expression may play a very important role in the development of different pathologies, including cancer and neurodegenerative diseases. By cloning and functionally characterizing the *P2rx7* gene

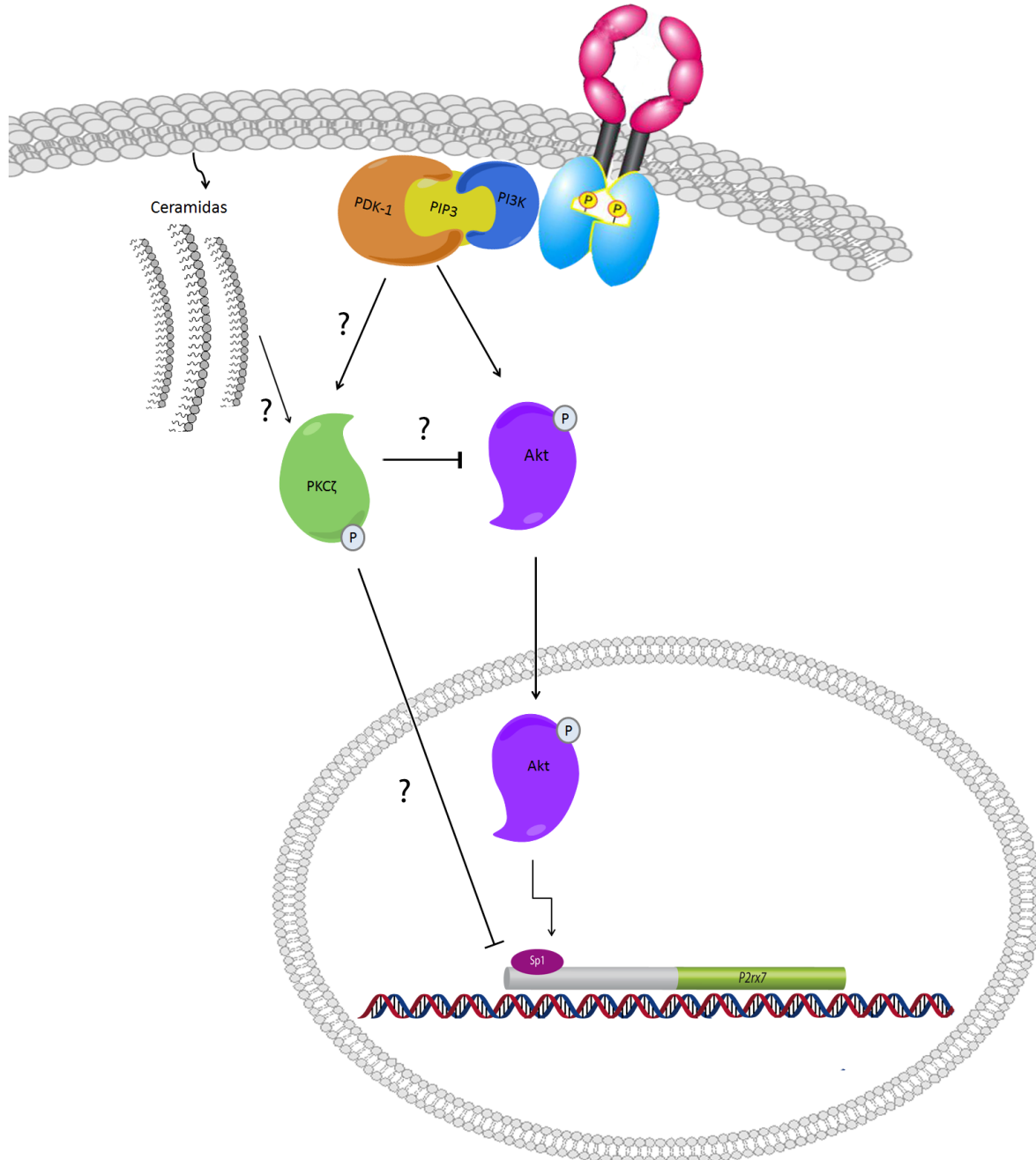


Figure A. Schematic summary of P2X7 receptor transcriptional regulation in neural cells. Serum withdrawal induces EGF receptor auto-activation activating PI3K/Akt pathway. Akt is responsible for the phosphorylation of the transcriptional factor Sp1. Otherwise, serum starvation induces PKCζ activation that negatively regulates P2X7 receptor expression. As net balance, the absence of serum produces an increase in the Sp1-dependent P2X7 receptor expression.

promoter, we have provided the first molecular evidence that Sp1 plays an important role in the control of *P2rx7* gene expression in the nervous system. Moreover, in serum withdrawal conditions, we have demonstrated that a significant increase in P2X7 receptor expression occurs, mainly due to a ligand-independent activation of EGFR. Downstream EGFR, PI3K/Akt pathway is involved in the regulation of Sp1 transcriptional activity, and consequently, in the control of *P2rx7* gene transcription. Finally, PKC ζ seems to play a critical role negatively regulating Sp1-mediated P2X7 receptor expression (Figure A).

Concluding remarks

1. Murine neuroblastoma cell line Neuro-2a expresses mRNA and protein of several purinergic receptors, being P2X7 the only functional receptor in this cell line.
2. *P2rx7* gene proximal promoter region lacks TATA or CAAT boxes, and contains seven putative SP1 sites. These sites are mostly located close to the transcription start site.
3. The two closest to the transcription start site SP1 motifs are fully functional. In addition, these sites show a high degree of homology between the analysed mammalian species, not only in their sequence but also in their relative distance.
4. Sp1 transcription factor induces native P2X7 receptor expression in neural (neuroblastoma Neuro-2a) and non-neural (macrophages RAW 264.7) cell lines, as well as primary cultures of cortical neurons and astrocytes. Also, it has been confirmed the correlation between Sp1 and P2X7 receptor expression in newborn (P0) brain mice.
5. Serum withdrawal induces P2X7 receptor expression through the activation of EGF receptor in a ligand-independent way.
6. EGF receptor activation induces a signaling cascade that involves PI3K/Akt pathway. Akt leads Sp1 phosphorylation favoring an increase in P2X7 receptor expression.
7. Serum withdrawal induces PKC ζ activation which in turn, negatively regulates *P2rx7* gene expression.

Bibliography

- Abbracchio, M.P., J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, M.T. Miras-Portugal, B.F. King, C. Gachet, K.A. Jacobson, G.A. Weisman, and G. Burnstock. 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in pharmacological sciences*. 24:52-55.
- Adinolfi, E., L. Raffaghello, A.L. Giuliani, L. Cavazzini, M. Capece, P. Chiozzi, G. Bianchi, G. Kroemer, V. Pistoia, and F. Di Virgilio. 2012. Expression of P2X₇ receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res*. 72:2957-2969.
- Albi, E., S. Cataldi, E. Bartoccini, M.V. Magni, F. Marini, F. Mazzoni, G. Rainaldi, M. Evangelista, and M. Garcia-Gil. 2006. Nuclear sphingomyelin pathway in serum deprivation-induced apoptosis of embryonic hippocampal cells. *J Cell Physiol*. 206:189-195.
- Armstrong, S.A., D.A. Barry, R.W. Leggett, and C.R. Mueller. 1997. Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem*. 272:13489-13495.
- Azizkhan, J.C., D.E. Jensen, A.J. Pierce, and M. Wade. 1993. Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 3:229-254.
- Azzi, A., D. Boscoboinik, and C. Hensey. 1992. The protein kinase C family. *Eur J Biochem*. 208:547-557.
- Bae, I.H., M.J. Park, S.H. Yoon, S.W. Kang, S.S. Lee, K.M. Choi, and H.D. Um. 2006. Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1. *Cancer Res*. 66:4991-4995.
- Bandyopadhyay, G., M.L. Standaert, M.P. Sajan, Y. Kanoh, A. Miura, U. Braun, F. Kruse, M. Leitges, and R.V. Farese. 2004. Protein kinase C-lambda knockout in embryonic stem cells and adipocytes impairs insulin-stimulated glucose transport. *Mol Endocrinol*. 18:373-383.
- Barr, L.F., S.E. Campbell, and S.B. Baylin. 1997. Protein kinase C-beta 2 inhibits cycling and decreases c-myc-induced apoptosis in small cell lung cancer cells. *Cell Growth Differ*. 8:381-392.
- Berra, E., M.M. Municio, L. Sanz, S. Frutos, M.T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 1997. Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Mol Cell Biol*. 17:4346-4354.
- Bhaskar, P.T., and N. Hay. 2007. The two TORCs and Akt. *Developmental cell*. 12:487-502.
- Bird, A.P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 321:209-213.
- Black, A.R., J.D. Black, and J. Azizkhan-Clifford. 2001. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol*. 188:143-160.
- Bo, X., M. Kim, S.L. Nori, R. Schoepfer, G. Burnstock, and R.A. North. 2003. Tissue distribution of P2X₄ receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res*. 313:159-165.
- Bonello, M.R., and L.M. Khachigian. 2004. Fibroblast growth factor-2 represses platelet-derived growth factor receptor-alpha (PDGFR-alpha) transcription via ERK1/2-dependent Sp1 phosphorylation and an atypical cis-acting element in the proximal PDGFR-alpha promoter. *J Biol Chem*. 279:2377-2382.
- Bourbon, N.A., L. Sandirasegarane, and M. Kester. 2002. Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase Czeta: implications for growth arrest. *J Biol Chem*. 277:3286-3292.
- Bouwman, P., and S. Philipsen. 2002. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol*. 195:27-38.
- Breitkreutz, D., L. Braiman-Wikman, N. Daum, M.F. Denning, and T. Tennenbaum. 2007.

- Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol.* 133:793-808.
- Buell, G.N., F. Talabot, A. Gos, J. Lorenz, E. Lai, M.A. Morris, and S.E. Antonarakis. 1998. Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels.* 5:347-354.
- Burgering, B.M., and P.J. Coffey. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 376:599-602.
- Burnstock, G., and C. Kennedy. 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol.* 16:433-440.
- Burnstock, G., U. Krugel, M.P. Abbracchio, and P. Illes. 2011. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol.* 95:229-274.
- Calcerrada, M.C., B.G. Miguel, L. Martin, R.E. Catalan, and A.M. Martinez. 2002. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in nuclear translocation of protein kinase C zeta induced by C2-ceramide in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 514:361-365.
- Cantley, L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 296:1655-1657.
- Clark, S.J., J. Harrison, and P.L. Molloy. 1997. Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene.* 195:67-71.
- Clyne, J.D., L.F. Wang, and R.I. Hume. 2002. Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. *J Neurosci.* 22:3873-3880.
- Coddou, C., Z. Yan, T. Obsil, J.P. Huidobro-Toro, and S.S. Stojilkovic. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews.* 63:641-683.
- Colombaioni, L., L.M. Frago, I. Varela-Nieto, R. Pesi, and M. Garcia-Gil. 2002. Serum deprivation increases ceramide levels and induces apoptosis in undifferentiated HN9.10e cells. *Neurochemistry international.* 40:327-336.
- Cross, D.A., D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B.A. Hemmings. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378:785-789.
- Chatterjee, S., K. Zaman, H. Ryu, A. Conforto, and R.R. Ratan. 2001. Sequence-selective DNA binding drugs mithramycin A and chromomycin A3 are potent inhibitors of neuronal apoptosis induced by oxidative stress and DNA damage in cortical neurons. *Ann Neurol.* 49:345-354.
- Chauhan, V.P., A. Chauhan, D.S. Deshmukh, and H. Bockerhoff. 1990. Lipid activators of protein kinase C. *Life Sci.* 47:981-986.
- Cheewatrakoolpong, B., H. Gilchrest, J.C. Anthes, and S. Greenfeder. 2005. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 332:17-27.
- Chen, J.Y., M.C. Wang, and W.C. Hung. 2009. Transcriptional activation of Skp2 by BCR-ABL in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res.* 33:1520-1524.
- Chen, X., and M.D. Resh. 2002. Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 277:49631-49637.
- Chou, M.M., W. Hou, J. Johnson, L.K. Graham, M.H. Lee, C.S. Chen, A.C. Newton, B.S. Schaffhausen, and A. Toker. 1998. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol.* 8:1069-1077.
- Chu, S., C.A. Cockrell, and T.J. Ferro. 2003. Expression of alpha-ENaC2 is dependent on an upstream Sp1 binding motif and is modulated by protein phosphatase 1 in lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 303:1159-1168.
- Chun, R.F., O.J. Semmes, C. Neuveut, and K.T. Jeang. 1998. Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Virol.* 72:2615-2629.

- Dempsey, E.C., A.C. Newton, D. Mochly-Rosen, A.P. Fields, M.E. Reyland, P.A. Insel, and R.O. Messing. 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279:L429-438.
- Di Virgilio, F., D. Ferrari, and E. Adinolfi. 2009. P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal*. 5:251-256.
- Diaz-Hernandez, J.I., R. Gomez-Villafuertes, M. Leon-Otegui, L. Hontecillas-Prieto, A. Del Puerto, J.L. Trejo, J.J. Lucas, J.J. Garrido, J. Gualix, M.T. Miras-Portugal, and M. Diaz-Hernandez. 2011. In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3beta and secretases. *Neurobiol Aging*. 33:1816-1828.
- Diaz-Hernandez, M., A. del Puerto, J.I. Diaz-Hernandez, M. Diez-Zaera, J.J. Lucas, J.J. Garrido, and M.T. Miras-Portugal. 2008. Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci*. 121:3717-3728.
- Diaz-Hernandez, M., M. Diez-Zaera, J. Sanchez-Nogueiro, R. Gomez-Villafuertes, J.M. Canals, J. Alberch, M.T. Miras-Portugal, and J.J. Lucas. 2009. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J*. 23:1893-1906.
- Donnelly-Roberts, D.L., and M.F. Jarvis. 2007. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol*. 151:571-579.
- Doornbos, R.P. 1999. Protein Kinase Czeta Is a Negative Regulator of Protein Kinase B Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 274:8589-8596.
- Dunah, A.W., H. Jeong, A. Griffin, Y.M. Kim, D.G. Standaert, S.M. Hersch, M.M. Mouradian, A.B. Young, N. Tanese, and D. Krainc. 2002. Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science*. 296:2238-2243.
- Dutil, E.M., A. Toker, and A.C. Newton. 1998. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol*. 8:1366-1375.
- Edwards, F.A., A.J. Gibb, and D. Colquhoun. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*. 359:144-147.
- Ennion, S.J., and R.J. Evans. 2002. Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol*. 61:303-311.
- Evangelopoulos, M.E., J. Weis, and A. Kruttgen. 2005. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene*. 24:3309-3318.
- Evans, R.J. 1996. The molecular biology of P2X receptors. *Journal of autonomic pharmacology*. 16:309-310.
- Evans, R.J., V. Derkach, and A. Surprenant. 1992. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*. 357:503-505.
- Ferrante, R.J., H. Ryu, J.K. Kubilus, S. D'Mello, K.L. Sugars, J. Lee, P. Lu, K. Smith, S. Browne, M.F. Beal, B.S. Kristal, I.G. Stavrovskaya, S. Hewett, D.C. Rubinsztein, B. Langley, and R.R. Ratan. 2004. Chemotherapy for the brain: the antitumor antibiotic mithramycin prolongs survival in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 24:10335-10342.
- Fojas de Borja, P., N.K. Collins, P. Du, J. Azizkhan-Clifford, and M. Mudryj. 2001. Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *EMBO J*. 20:5737-5747.
- Franke, H., and P. Illes. 2006. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology & therapeutics*. 109:297-324.
- Fruman, D.A., R.E. Meyers, and L.C. Cantley. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev*

- Biochem.* 67:481-507.
- Fuller, S.J., L. Stokes, K.K. Skarratt, B.J. Gu, and J.S. Wiley. 2009. Genetics of the P2X7 receptor and human disease. *Purinergic Signal.* 5:257-262.
- Furuchi, T., and R.G. Anderson. 1998. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem.* 273:21099-21104.
- Gomez-Villafuertes, R., J. Gualix, and M.T. Miras-Portugal. 2001. Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem.* 77:84-93.
- Gong, S., C. Zheng, M.L. Doughty, K. Losos, N. Didkovsky, U.B. Schambra, N.J. Nowak, A. Joyner, G. Leblanc, M.E. Hatten, and N. Heintz. 2003. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature.* 425:917-925.
- Gu, B.J., R. Sluyter, K.K. Skarratt, A.N. Shemon, L.P. Dao-Ung, S.J. Fuller, J.A. Barden, A.L. Clarke, S. Petrou, and J.S. Wiley. 2004. An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem.* 279:31287-31295.
- Gualix, J., R. Gomez-Villafuertes, M. Diaz-Hernandez, and M.T. Miras-Portugal. 2003. Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J Neurochem.* 87:160-171.
- Gutierrez-Martin, Y., D. Bustillo, R. Gomez-Villafuertes, J. Sanchez-Nogueiro, C. Torregrosa-Hetland, T. Binz, L.M. Gutierrez, M.T. Miras-Portugal, and A.R. Artalejo. 2011. P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 286:11370-11381.
- Hagiwara, H., M. Iyo, and K. Hashimoto. 2009. Mithramycin protects against dopaminergic neurotoxicity in the mouse brain after administration of methamphetamine. *Brain Res.* 1301:189-196.
- Haltiwanger, R.S., K. Grove, and G.A. Philipsberg. 1998. Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem.* 273:3611-3617.
- Han, I., and J.E. Kudlow. 1997. Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol.* 17:2550-2558.
- Hart, G.W. 1997. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem.* 66:315-335.
- Ho, R., J.E. Minturn, T. Hishiki, H. Zhao, Q. Wang, A. Cnaan, J. Maris, A.E. Evans, and G.M. Brodeur. 2005. Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 65:9868-9875.
- Jackson, S.P., J.J. MacDonald, S. Lees-Miller, and R. Tjian. 1990. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell.* 63:155-165.
- Jackson, S.P., and R. Tjian. 1988. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell.* 55:125-133.
- Jang, I.S., J.S. Rhee, H. Kubota, N. Akaike, and N. Akaike. 2001. Developmental changes in P2X purinoceptors on glycinergic presynaptic nerve terminals projecting to rat substantia gelatinosa neurones. *J Physiol.* 536:505-519.
- Jarvis, M.F., and B.S. Khakh. 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology.* 56:208-215.
- Jia, Z., J. Zhang, D. Wei, L. Wang, P. Yuan, X. Le, Q. Li, J. Yao, and K. Xie. 2007. Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer Res.* 67:4878-4885.
- Jiang, L.H., A.B. Mackenzie, R.A. North, and A. Surprenant. 2000. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol.* 58:82-88.

- Jo, Y.H., and L.W. Role. 2002. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci.* 22:4794-4804.
- Jo, Y.H., and R. Schlichter. 1999. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature neuroscience.* 2:241-245.
- Jorgensen, N.R., L.B. Husted, K.K. Skarratt, L. Stokes, C.L. Tofteng, T. Kvist, J.E. Jensen, P. Eiken, K. Brixen, S. Fuller, R. Clifton-Bligh, A. Gartland, P. Schwarz, B.L. Langdahl, and J.S. Wiley. 2012. Single-nucleotide polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with post-menopausal bone loss and vertebral fractures. *European journal of human genetics : EJHG.* 20:675-681.
- Kadonaga, J.T., K.R. Carner, F.R. Masiarz, and R. Tjian. 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.* 51:1079-1090.
- Kavurma, M.M., F.S. Santiago, E. Bonfoco, and L.M. Khachigian. 2001. Sp1 phosphorylation regulates apoptosis via extracellular FasL-Fas engagement. *J Biol Chem.* 276:4964-4971.
- Kazanietz, M.G., L.B. Areces, A. Bahador, H. Mischak, J. Goodnight, J.F. Mushinski, and P.M. Blumberg. 1993. Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol Pharmacol.* 44:298-307.
- Kennett, S.B., A.J. Udvadia, and J.M. Horowitz. 1997. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 25:3110-3117.
- Khakh, B.S., G. Burnstock, C. Kennedy, B.F. King, R.A. North, P. Seguela, M. Voigt, and P.P. Humphrey. 2001. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological reviews.* 53:107-118.
- Khakh, B.S., D. Gittermann, D.A. Cockayne, and A. Jones. 2003. ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci.* 23:7426-7437.
- Khakh, B.S., and R.A. North. 2006. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature.* 442:527-532.
- Kikkawa, U., A. Kishimoto, and Y. Nishizuka. 1989. The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu Rev Biochem.* 58:31-44.
- Koller, C.A., and D.M. Miller. 1986. Preliminary observations on the therapy of the myeloid blast phase of chronic granulocytic leukemia with plicamycin and hydroxyurea. *N Engl J Med.* 315:1433-1438.
- Korenaga, R., K. Yamamoto, N. Ohura, T. Sokabe, A. Kamiya, and J. Ando. 2001. Sp1-mediated downregulation of P2X4 receptor gene transcription in endothelial cells exposed to shear stress. *American journal of physiology.* 280:H2214-2221.
- Kovac, J., H. Oster, and M. Leitges. 2007. Expression of the atypical protein kinase C (aPKC) isoforms iota/lambda and zeta during mouse embryogenesis. *Gene expression patterns : GEP.* 7:187-196.
- Kutoh, E., J.B. Margot, and J. Schwander. 1999. Identification and characterization of the putative retinoblastoma control element of the rat insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Cancer Lett.* 136:187-194.
- Lakshmi, S., and P.G. Joshi. 2006. Activation of Src/kinase/phospholipase C/mitogen-activated protein kinase and induction of neurite expression by ATP, independent of nerve growth factor. *Neuroscience.* 141:179-189.
- Larsen, F., G. Gundersen, R. Lopez, and H. Prydz. 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics.* 13:1095-1107.
- Lawlor, M.A., and D.R. Alessi. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and

- insulin responses? *J Cell Sci.* 114:2903-2910.
- Le Good, J.A., W.H. Ziegler, D.B. Parekh, D.R. Alessi, P. Cohen, and P.J. Parker. 1998. Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 281:2042-2045.
- Leon, D., C. Hervas, and M.T. Miras-Portugal. 2006. P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *The European journal of neuroscience.* 23:2999-3013.
- Li, C.M., S.J. Campbell, D.S. Kumararatne, R. Bellamy, C. Ruwende, K.P. McAdam, A.V. Hill, and D.A. Lammas. 2002a. Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *J Infect Dis.* 186:1458-1462.
- Li, C.M., S.J. Campbell, D.S. Kumararatne, A.V. Hill, and D.A. Lammas. 2002b. Response heterogeneity of human macrophages to ATP is associated with P2X7 receptor expression but not to polymorphisms in the P2RX7 promoter. *FEBS Lett.* 531:127-131.
- Li, S.H., A.L. Cheng, H. Zhou, S. Lam, M. Rao, H. Li, and X.J. Li. 2002c. Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol.* 22:1277-1287.
- Liu, Y., X.S. Liu, L. Wei, R.B. Altman, and S. Batzoglou. 2004. Eukaryotic regulatory element conservation analysis and identification using comparative genomics. *Genome research.* 14:451-458.
- Lucas, M., and V. Sanchez-Margalet. 1995. Protein kinase C involvement in apoptosis. *Gen Pharmacol.* 26:881-887.
- Marin, M., A. Karis, P. Visser, F. Grosveld, and S. Philipsen. 1997. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell.* 89:619-628.
- Messerschmidt, A., S. Macieira, M. Velarde, M. Badeker, C. Benda, A. Jestel, H. Brandstetter, T. Neufeld, and M. Blaesse. 2005. Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C- ι reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif. *J Mol Biol.* 352:918-931.
- Milanini-Mongiati, J., J. Pouyssegur, and G. Pages. 2002. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem.* 277:20631-20639.
- Milanini, J., F. Vinals, J. Pouyssegur, and G. Pages. 1998. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem.* 273:18165-18172.
- Mochly-Rosen, D. 1995. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science.* 268:247-251.
- Moghal, N., and P.W. Sternberg. 1999. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol.* 11:190-196.
- Murray, N.R., and A.P. Fields. 1997. Atypical protein kinase C ι protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 272:27521-27524.
- Muthuswamy, S.K., M. Gilman, and J.S. Brugge. 1999. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol.* 19:6845-6857.
- Nakatsuka, T., K. Tsuzuki, J.X. Ling, H. Sonobe, and J.G. Gu. 2003. Distinct roles of P2X receptors in modulating glutamate release at different primary sensory synapses in rat spinal cord. *Journal of neurophysiology.* 89:3243-3252.
- Neid, M., K. Datta, S. Stephan, I. Khanna, S. Pal, L. Shaw, M. White, and D. Mukhopadhyay. 2004. Role of insulin receptor substrates and protein kinase C- ζ in vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem.* 279:3941-3948.

- Neri, L.M., A.M. Martelli, P. Borgatti, M.L. Colamussi, M. Marchisio, and S. Capitani. 1999. Increase in nuclear phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate synthesis precede PKC-zeta translocation to the nucleus of NGF-treated PC12 cells. *FASEB J.* 13:2299-2310.
- Nicke, A., H.G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler, and G. Schmalzing. 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17:3016-3028.
- North, R.A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82:1013-1067.
- Ortega, F., R. Perez-Sen, E.G. Delicado, and M.T. Miras-Portugal. 2009. P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotoxicity research.* 15:193-204.
- Pan, Q., S. Yang, Y. Wei, F. Sun, and Z. Li. 2010. SP1 acts as a key factor, contributes to upregulation of ADAM23 expression under serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 401:306-312.
- Pankratov, Y., U. Lalo, O.A. Krishtal, and A. Verkhratsky. 2009. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience.* 158:137-148.
- Pivorius, A., J. Savickiene, G. Treigyte, V. Tunaitis, R. Navakaskiene, and K.E. Magnusson. 2007. PI 3-K signaling pathway suppresses PMA-induced expression of p21WAF1/Cip1 in human leukemia cells. *Mol Cell Biochem.* 302:9-18.
- Pore, N., S. Liu, H.K. Shu, B. Li, D. Haas-Kogan, D. Stokoe, J. Milanini-Mongiat, G. Pages, D.M. O'Rourke, E. Bernhard, and A. Maity. 2004. Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell.* 15:4841-4853.
- Qiu, Z., F. Norflus, B. Singh, M.K. Swindell, R. Buzescu, M. Bejarano, R. Chopra, B. Zucker, C.L. Benn, D.P. DiRocco, J.H. Cha, R.J. Ferrante, and S.M. Hersch. 2006. Sp1 is up-regulated in cellular and transgenic models of Huntington disease, and its reduction is neuroprotective. *J Biol Chem.* 281:16672-16680.
- Raffaghello, L., P. Chiozzi, S. Falzoni, F. Di Virgilio, and V. Pistoia. 2006. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res.* 66:907-914.
- Rafty, L.A., and L.M. Khachigian. 2001. Sp1 phosphorylation regulates inducible expression of platelet-derived growth factor B-chain gene via atypical protein kinase C-zeta. *Nucleic Acids Res.* 29:1027-1033.
- Rhee, J.S., Z.M. Wang, J. Nabekura, K. Inoue, and N. Akaike. 2000. ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSC frequency at dissociated rat dorsal horn interneuron synapses. *J Physiol.* 524 Pt 2:471-483.
- Ringerike, T., F.D. Blystad, F.O. Levy, I.H. Madhus, and E. Stang. 2002. Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci.* 115:1331-1340.
- Roberts, J.A., C. Vial, H.R. Digby, K.C. Agboh, H. Wen, A. Atterbury-Thomas, and R.J. Evans. 2006a. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452:486-500.
- Roberts, V.H., S.L. Greenwood, A.C. Elliott, C.P. Sibley, and L.H. Waters. 2006b. Purinergic receptors in human placenta: evidence for functionally active P2X4, P2X7, P2Y2, and P2Y6. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.* 290:R1374-1386.
- Robson, S.C., J. Seigny, and H. Zimmermann. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2:409-430.
- Roepstorff, K., P. Thomsen, K. Sandvig, and B. van Deurs. 2002. Sequestration of epidermal

- growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem.* 277:18954-18960.
- Romagnoli, R., P.G. Baraldi, O. Cruz-Lopez, C. Lopez-Cara, D. Preti, P.A. Borea, and S. Gessi. 2008. The P2X7 receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 12:647-661.
- Roos, M.D., K. Su, J.R. Baker, and J.E. Kudlow. 1997. O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol.* 17:6472-6480.
- Ryu, H., J. Lee, S.W. Hagerty, B.Y. Soh, S.E. McAlpin, K.A. Cormier, K.M. Smith, and R.J. Ferrante. 2006. ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:19176-19181.
- Saffer, J.D., S.P. Jackson, and M.B. Annarella. 1991. Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol.* 11:2189-2199.
- Shields, J.M., and V.W. Yang. 1997. Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Kruppel-like factor define a subfamily of closely related Kruppel proteins. *J Biol Chem.* 272:18504-18507.
- Siegfried, Z., S. Eden, M. Mendelsohn, X. Feng, B.Z. Tsuberi, and H. Cedar. 1999. DNA methylation represses transcription in vivo. *Nature genetics.* 22:203-206.
- Silinsky, E.M., V. Gerzanich, and S.M. Vanner. 1992. ATP mediates excitatory synaptic transmission in mammalian neurones. *Br J Pharmacol.* 106:762-763.
- Skaper, S.D., P. Debetto, and P. Giusti. 2010. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J.* 24:337-345.
- Song, A., A. Patel, K. Thamtrakoln, C. Liu, D. Feng, C. Clayberger, and A.M. Krensky. 2002a. Functional domains and DNA-binding sequences of RFLAT-1/KLF13, a Kruppel-like transcription factor of activated T lymphocytes. *J Biol Chem.* 277:30055-30065.
- Song, C.Z., K. Keller, K. Murata, H. Asano, and G. Stamatoyannopoulos. 2002b. Functional interaction between coactivators CBP/p300, PCAF, and transcription factor FKLF2. *J Biol Chem.* 277:7029-7036.
- Sorensen, P., and E. Wintersberger. 1999. Sp1 and NF-Y are necessary and sufficient for growth-dependent regulation of the hamster thymidine kinase promoter. *J Biol Chem.* 274:30943-30949.
- Soto, F., M. Garcia-Guzman, J.M. Gomez-Hernandez, M. Hollmann, C. Karschin, and W. Stuhmer. 1996. P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3684-3688.
- Spencer, J.A., and R.P. Misra. 1999. Expression of the SRF gene occurs through a Ras/Sp/SRF-mediated-mechanism in response to serum growth signals. *Oncogene.* 18:7319-7327.
- Sperlagh, B., A. Heinrich, and C. Csolle. 2007. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic Signal.* 3:269-284.
- Sperlagh, B., A. Kofalvi, J. Deuchars, L. Atkinson, C.J. Milligan, N.J. Buckley, and E.S. Vizi. 2002. Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J Neurochem.* 81:1196-1211.
- Sperlagh, B., E.S. Vizi, K. Wirkner, and P. Illes. 2006. P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 78:327-346.
- Spiegel, S., D. Foster, and R. Kolesnick. 1996. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol.* 8:159-167.
- Stack, E.C., S.J. Del Signore, R. Luthi-Carter, B.Y. Soh, D.R. Goldstein, S. Matson, S. Goodrich, A.L. Markey, K. Cormier, S.W. Hagerty, K. Smith, H. Ryu, and R.J. Ferrante. 2007. Modulation of nucleosome dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 16:1164-1175.
- Stokes, L., S.J. Fuller, R. Sluyter, K.K. Skarratt, B.J. Gu, and J.S. Wiley. 2010. Two haplotypes of the P2X(7) receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1beta secretion. *FASEB J.* 24:2916-2927.

- Sun, S.H. 2010. Roles of P2X7 receptor in glial and neuroblastoma cells: the therapeutic potential of P2X7 receptor antagonists. *Mol Neurobiol.* 41:351-355.
- Suske, G., E. Bruford, and S. Philipsen. 2005. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics.* 85:551-556.
- Svetek, J., M. Schara, S. Pecar, M. Hergenbahn, and E. Hecker. 1995. Spectroscopic characterization of specific phorbol ester binding to PKC-receptor sites in membranes in situ. *Carcinogenesis.* 16:2589-2592.
- Takahara, T., S.I. Kanazu, S. Yanagisawa, and H. Akanuma. 2000. Heterogeneous Sp1 mRNAs in human HepG2 cells include a product of homotypic trans-splicing. *J Biol Chem.* 275:38067-38072.
- Takai, Y., A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori, and Y. Nishizuka. 1979. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J Biol Chem.* 254:3692-3695.
- Tan, N.Y., and L.M. Khachigian. 2009. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol.* 29:2483-2488.
- Tan, N.Y., V.C. Midgley, M.M. Kavurma, F.S. Santiago, X. Luo, R. Peden, R.G. Fahmy, M.C. Berndt, M.P. Molloy, and L.M. Khachigian. 2008. Angiotensin II-inducible platelet-derived growth factor-D transcription requires specific Ser/Thr residues in the second zinc finger region of Sp1. *Circ Res.* 102:e38-51.
- Tapias, A., J. Auriol, D. Forget, J.H. Enzlin, O.D. Scharer, F. Coin, B. Coulombe, and J.M. Egly. 2004. Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *J Biol Chem.* 279:19074-19083.
- Toker, A. 1998. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci.* 3:D1134-1147.
- Torres, G.E., T.M. Egan, and M.M. Voigt. 1999. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem.* 274:6653-6659.
- Tozaki-Saitoh, H., S. Koizumi, Y. Sato, M. Tsuda, T. Nagao, and K. Inoue. 2006. Retinoic acids increase P2X2 receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC-12 cells. *Mol Pharmacol.* 70:319-328.
- Tsai, F.Y., G. Keller, F.C. Kuo, M. Weiss, J. Chen, M. Rosenblatt, F.W. Alt, and S.H. Orkin. 1994. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature.* 371:221-226.
- Tsuda, M., H. Tozaki-Saitoh, and K. Inoue. 2010. Pain and purinergic signaling. *Brain Res Rev.* 63:222-232.
- van Weeren, P.C., K.M. de Bruyn, A.M. de Vries-Smits, J. van Lint, and B.M. Burgering. 1998. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem.* 273:13150-13156.
- von Kugelgen, I., and T.K. Harden. 2011. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Advances in pharmacology.* 61:373-415.
- von Kugelgen, I., and A. Wetter. 2000. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 362:310-323.
- Vulchanova, L., M.S. Riedl, S.J. Shuster, G. Buell, A. Surprenant, R.A. North, and R. Elde. 1997. Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology.* 36:1229-1242.
- Wang, R., Y. Luo, P.T. Ly, F. Cai, W. Zhou, H. Zou, and W. Song. 2012. Sp1 regulates human huntingtin gene expression. *J Mol Neurosci.* 47:311-321.
- Wang, Z.M., S. Katsurabayashi, J.S. Rhee, M. Brodwick, and N. Akaike. 2001. Substance P abolishes the facilitatory effect of ATP on spontaneous glycine release in neurons of

- the trigeminal nucleus pars caudalis. *J Neurosci.* 21:2983-2991.
- Wells, A. 1999. EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 31:637-643.
- Wells, A., K. Gupta, P. Chang, S. Swindle, A. Glading, and H. Shiraha. 1998. Epidermal growth factor receptor-mediated motility in fibroblasts. *Microscopy research and technique.* 43:395-411.
- Westover, E.J., D.F. Covey, H.L. Brockman, R.E. Brown, and L.J. Pike. 2003. Cholesterol depletion results in site-specific increases in epidermal growth factor receptor phosphorylation due to membrane level effects. Studies with cholesterol enantiomers. *J Biol Chem.* 278:51125-51133.
- Whelan, R.D., and P.J. Parker. 1998. Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene.* 16:1939-1944.
- Xie, H., M.A. Pallero, K. Gupta, P. Chang, M.F. Ware, W. Witke, D.J. Kwiatkowski, D.A. Lauffenburger, J.E. Murphy-Ullrich, and A. Wells. 1998. EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J Cell Sci.* 111 (Pt 5):615-624.
- Zhang, W., S. Kadam, B.M. Emerson, and J.J. Bieker. 2001. Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Kruppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex. *Mol Cell Biol.* 21:2413-2422.
- Zhang, Y., M. Liao, and M.L. Dufau. 2006. Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase C ζ -induced phosphorylation of Sp1 and p107 repressor release have a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression [corrected] of transcription of the luteinizing hormone receptor gene. *Mol Cell Biol.* 26:6748-6761.
- Zhao, J., and S.J. Ennion. 2006. Sp1/3 and NF-1 mediate basal transcription of the human P2X1 gene in megakaryoblastic MEG-01 cells. *BMC Mol Biol.* 7:10.
- Zhou, L., L. Luo, X. Qi, X. Li, and G.I. Gorodeski. 2009. Regulation of P2X(7) gene transcription. *Purinergic Signal.* 5:409-426.
- Zimmermann, H. 2006. Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Foundation symposium.* 276:113-128; discussion 128-130, 233-117, 275-181.

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA PURINÉRGICO.

1.1. Los nucleótidos en la neurotransmisión.

El ATP (adenosina 5'-trifosfato) es una molécula indispensable para la vida ya que participa en numerosos procesos cruciales para el funcionamiento celular. A nivel intracelular actúa como fuente de energía en el metabolismo celular, participa en la regulación enzimática, el mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana, el trabajo mecánico en el movimiento celular y es parte estructural de los nucleótidos de adenina. Estas evidencias unidas a que el ATP no puede atravesar libremente la membrana plasmática de las células debido a su gran tamaño y naturaleza iónica, y a que en el exterior de la célula el ATP es hidrolizado rápidamente por enzimas extracelulares denominadas ectonucleotidasas, hizo pensar durante mucho tiempo que el ATP ejercía sus funciones exclusivamente en el interior celular, provocando un enorme retraso en el estudio de su papel como mensajero extracelular. Hoy en día se sabe que el ATP participa a nivel extracelular en una gran variedad de procesos entre los que destacan la contracción muscular, la secreción endocrina y paracrina, la respuesta inmune e inflamatoria, la agregación plaquetaria, la función cardíaca y, dentro del Sistema Nervioso Central (SNC), la transmisión del dolor, los fenómenos de neuroprotección, el control central de las funciones autónomas y la neurotransmisión (Burnstock, 1997; Burnstock, 2007a; Burnstock et al., 2011; Dubyak and el-Moatassim, 1993; Gordon, 1986; Khakh and North, 2012).

En 1929 Drury y Szent-Györgyi aportaron las primeras evidencias de la actuación de las purinas como mensajeros extracelulares en diversos estudios en el sistema cardiovascular (Drury and Szent-Gyorgyi, 1929). Sin embargo, tuvieron que pasar 40 años hasta el descubrimiento de la existencia de los nervios denominados no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) que liberan ATP como neurotransmisor (Burnstock et al., 1970; Burnstock et al., 1972). Las primeras evidencias directas de las acciones extracelulares del ATP en el SNC se obtuvieron en 1983 registrando corrientes de entrada tras la estimulación con ATP en neuronas del asta dorsal de la médula espinal y en neuronas de diversos ganglios sensoriales (Jahr and Jessell, 1983; Krishtal et al., 1983). Posteriormente se describió la implicación del ATP en la transmisión de sensaciones propioceptivas (Salter et al., 1993) y de señales nociceptivas medulares (Chen et al., 1995), en corrientes postsinápticas excitatorias en secciones de habénula medial (Edwards et al., 1992), en el asta dorsal de la médula espinal (Bardoni et al.,

1997) y en el hipocampo (Pankratov et al., 1998). Todo ello puso en evidencia que el ATP debe ser considerado como un verdadero neurotransmisor rápido dentro del SNC. Además, los nucleótidos pueden ejercer acciones a largo plazo en las neuronas, participando en procesos de diferenciación, crecimiento de neuritas o supervivencia, además de intervenir en diversas patologías como la isquemia, el trauma cerebral o la neurodegeneración (Burnstock, 2007a; Burnstock, 2008).

1.2. Almacenamiento y liberación de nucleótidos.

El papel extracelular del ATP o de cualquier otro nucleótido requiere en primer lugar que dicho compuesto se localice en el medio extracelular. En un principio se asumió que la única fuente de ATP extracelular procedía de células dañadas o muertas. Sin embargo, actualmente se acepta que la liberación de ATP de células sanas es un fenómeno fisiológico mediado por mecanismos exocitóticos y no exocitóticos (Bodin and Burnstock, 2001; Lazarowski, 2012; Lazarowski et al., 2003). Actualmente existe un gran número de evidencias que permiten establecer firmemente el concepto de cotransmisión, es decir, que una misma célula nerviosa pueda almacenar y liberar diferentes tipos de neurotransmisores (Pankratov et al., 2006). Se ha descrito la presencia de ATP y otros nucleótidos en una amplia variedad de vesículas de almacenamiento y secreción, como por ejemplo las vesículas aminérgicas y colinérgicas en tejidos neurales y neuroendocrinos, o los gránulos de plaquetas y mastocitos (Burnstock, 2007a). También se ha caracterizado el coalmacenamiento y coliberación de ATP desde terminales colinérgicas (Richardson and Brown, 1987), noradrenérgicas simpáticas y parasimpáticas (von Kugelgen and Starke, 1991) y GABAérgicas del asta dorsal de la médula espinal (Jo and Role, 2002; Jo and Schlichter, 1999), además de la liberación exocitótica y dependiente de Ca^{2+} del ATP en terminales nerviosas centrales aisladas (Sawynok et al., 1993). El almacenamiento de nucleótidos en el interior de vesículas de secreción permite alcanzar concentraciones extracelulares de ATP superiores a 100 mM, mucho mayores que las halladas en el citosol (2-5 mM), poniendo de manifiesto la necesidad de un sistema de transporte vesicular activo. En un principio se identificaron algunas características funcionales del transporte de nucleótidos al interior de vesículas de secreción, incluyendo una baja especificidad de sustrato (permitiendo así el transporte de una gran variedad de nucleótidos) y un comportamiento cinético mnemónico (Gualix et al., 1997; Gualix et al., 1999). Posteriormente Sawada y col. identificaron la proteína SLC17A9 como el transportador vesicular de nucleótidos (Sawada et al., 2008). Se trata de una isoforma de la familia de los transportadores SLC17 con 12 segmentos transmembrana y 430 aminoácidos (aa), identificada tanto

en humano como en ratón. Se expresa fundamentalmente en cerebro y médula adrenal, donde juega un papel vital en el almacenamiento y liberación de nucleótidos dependiente de Cl^- (Sawada et al., 2008).

Los mecanismos implicados en la liberación no exocitótica de ATP no están totalmente identificados aunque se ha postulado que podrían estar mediados por una serie de transportadores o canales que formarían parte de la superfamilia de proteínas ABC ("ATP Binding Casette"). Actualmente la familia conocida como ABCC es la candidata más plausible. Esta familia contiene por el momento 7 genes *ABCC* (1-7), y las funciones y propiedades de algunas de estas proteínas son aún desconocidas. Entre sus miembros se encuentran los transportadores ABCC4 (MRP4) y ABCC5 (MRP5), que transportan fuera de la célula nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc). Otras hipótesis sugieren la participación de canales iónicos dependientes de voltaje, conexinas y otros miembros de las uniones estrechas entre células en este tipo de liberación (Bahima et al., 2006; Buettner et al., 2000; Eltzschig et al., 2006; Solsona, 2004).

1.3. Inactivación ecto-enzimática de los nucleótidos.

Como todos los neurotransmisores, una vez liberados, los nucleótidos deben ser retirados del medio extracelular. Para ello existen unas enzimas extracelulares específicas denominadas ectonucleotidasas que hidrolizan rápidamente los nucleótidos extracelulares, generando en última instancia los nucleósidos precursores que, en el caso de la adenosina, pueden actuar como ligandos fisiológicos sobre otro tipo de receptores denominados P1 (Harkness, 1968; Miki et al., 1986). Las ectonucleotidasas están formadas por varias familias de enzimas que se diferencian gracias a sus propiedades funcionales y moleculares. Varían en su preferencia y afinidad por el sustrato, en el producto formado, en la dependencia de cationes y en su pH óptimo. Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos y actúan consecutivamente dando lugar a cascadas de hidrólisis (Figura 1). Por lo tanto, las ectonucleotidasas no sólo controlan la vida media del nucleótido original, sino que, degradando o interconvirtiendo el ligando inicial, dan lugar a nuevos ligandos capaces de activar otros receptores purinérgicos. Las ectonucleotidasas suelen encontrarse ancladas a la membrana celular con su dominio catalítico orientado hacia el espacio extracelular, aunque también se han descrito formas solubles liberadas al medio (denominadas exonucleotidasas) a partir de vesículas sinápticas o como resultado de la hidrólisis de su anclaje a la membrana (Todorov et al., 1997). Las ectonucleotidasas se clasifican en cuatro subfamilias:

a) Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas): También se conocen como ecto-ATPasas, ecto-ADPasas, ecto-apiratasas o CD39. Hidrolizan nucleósidos tri- y difosfato, generando los correspondientes nucleósidos monofosfato, aunque los ratios de hidrólisis varían considerablemente entre las cuatro enzimas (Kukulski et al., 2005).

b) Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (E-NPP): Forman parte de la superfamilia de las fosfatasa alcalinas, con las que comparten su pH óptimo alcalino. Los tres miembros de esta familia de ectoenzimas, NPP1, 2 y 3, hidrolizan enlaces 5'-monodiestere en nucleótidos y sus derivados, generando la liberación de nucleósidos 5'-monofosfato (Goding et al., 2003; Stefan et al., 2005). También pueden hidrolizar otros compuestos, como los dinucleósidos polifosfato (Vollmayer et al., 2003).

c) Fosfatasa alcalinas: Al igual que las E-NPP, son miembros de la superfamilia de las fosfatasa alcalinas. Forman homodímeros con tres cationes en el sitio catalítico liberando el fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos e hidrolizan nucleósidos 5'-tri-, -di- y -monofosfato, generando los correspondientes nucleósidos precursores (Millan, 2006).

d) Ecto-5'-nucleotidasa o CD-73: Es una proteína dimerica de unión a zinc, anclada a la membrana por un glicosilfosfatidil inositol, que hidroliza los nucleósidos monofosfato generando los respectivos nucleósidos. Es decir, cataliza la etapa final de la cadena de hidrólisis de los nucleótidos. Se encuentra ampliamente distribuida en los diferentes tejidos (Zimmermann, 1996; Zimmermann, 2000).

1.4. Receptores de nucleótidos.

Implícito en el concepto de neurotransmisión purinérgica se encuentra la necesidad de la existencia de receptores purinérgicos. Los receptores de nucleótidos o receptores P2 se dividen en dos grandes familias en función de su estructura molecular y de los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación: los receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, y los receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando (Abbracchio and Burnstock, 1994; Burnstock, 2007b; Coddou et al., 2011; von Kugelgen and Harden, 2011). La identificación y caracterización de los receptores P2 no es tarea fácil debido a falta de

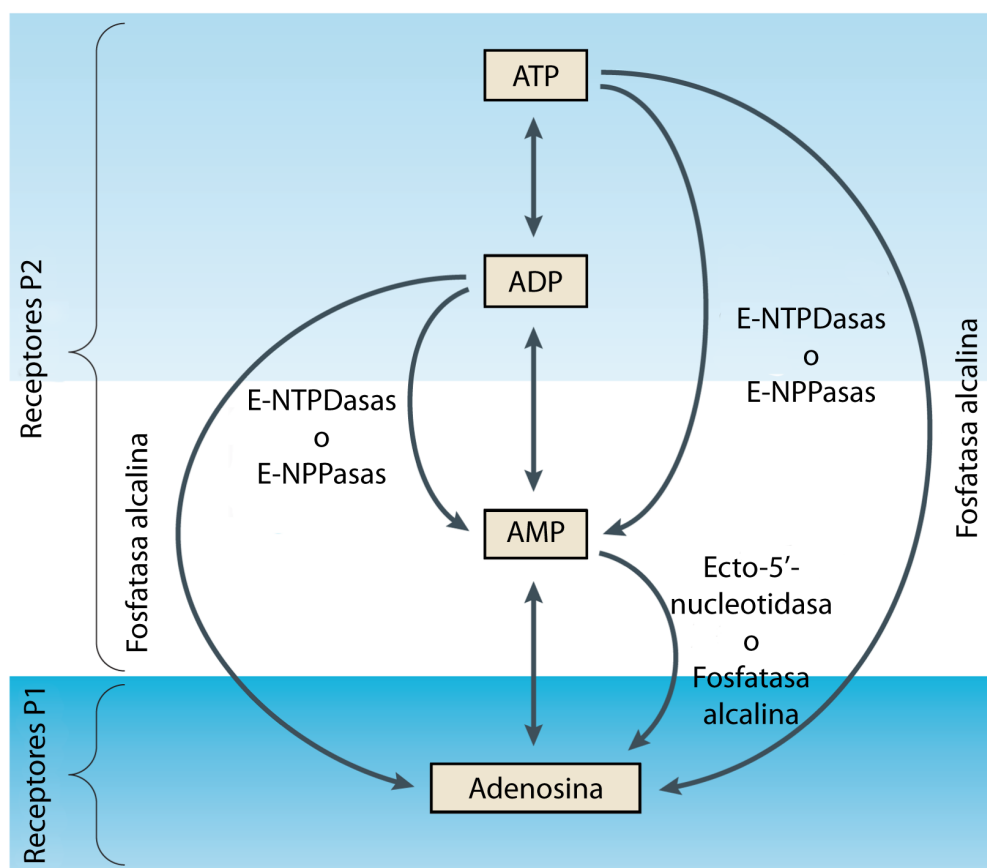


Figura 1. Metabolismo de los nucleótidos. Una vez liberados al espacio extracelular los nucleótidos activan receptores P2Y y P2X. Su acción finaliza por la actuación de enzimas ectonucleotidasas que degradan los nucleótidos trifosfato hasta adenosina, pudiendo generar nucleótidos difosfato que a su vez son agonistas de algunos receptores purinérgicos (P2). Por último se produce adenosina que activa a sus propios receptores (P1), siendo finalmente recaptada por un transportador específico al interior de la célula para la síntesis de nuevos nucleótidos. Figura modificada de Fields y col. (Fields and Burnstock, 2006).

agonistas y antagonistas específicos que permitan diferenciar los distintos subtipos de receptores que pueden estar presentes en un mismo tejido o tipo celular. Por este motivo se tiende a calificar a los receptores endógenos con el sufijo anglosajón “-like” hasta que en el futuro se apliquen criterios posteriores de distribución, mecanismo de señalización y farmacología que corroboren su identificación.

1.5. Receptores metabotrópicos P2Y.

Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) con 7 segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares quedando el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular. Poseen entre 328-377 aa, con un peso molecular de 41 a 53 kDa antes de ser glicosilados (von Kugelgen, 2006; von Kugelgen and Harden, 2011)}. La homología de secuencia dentro de este grupo no es muy alta, del orden del 35-40% de identidad promedio, pero sí suficiente para configurar una familia definida dentro

de la superfamilia GPCR. Hasta hace unos años se pensaba que los receptores GPCR se encontraban en la membrana en forma de monómeros. Sin embargo, desde mediados de los años 90, se empezó a pensar en estos receptores como dímeros u oligómeros. De hecho, dicha agregación podría ser esencial para su correcto tráfico y expresión en la membrana (Bouvier, 2001). Como es habitual en los GPCR, su señalización está acoplada a proteínas de membrana, como la fosfolipasa C (PLC) y la adenilato ciclasa, o a canales iónicos a través de la interacción con subunidades específicas de las proteínas G (Abbracchio et al., 2003; Ralevic and Burnstock, 1998).

Actualmente la familia consta de ocho miembros clonados y caracterizados en tejidos humanos o de mamíferos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007b). En base a su afinidad por los nucleótidos de adenina y/o uridina, los receptores P2Y se dividen en tres grupos. El primero está constituido por los receptores P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₁, que son activados únicamente por nucleótidos de adenina (ATP/ADP). Otro grupo lo forman receptores activados tanto por nucleótidos de adenina como de uracilo (receptores P2Y₂ y P2Y₄), y por último el receptor P2Y₆ que es específico para pirimidinas. Un caso especial es el del receptor P2Y₁₄, activado por UDP-glucosa y por otros UDP-azúcares (Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007b; von Kugelgen, 2006). Los receptores P2Y se expresan a lo largo de todo el organismo, regulando por sí mismos o modulando multitud de funciones fisiológicas (Fischer and Krugel, 2007). En el SNC, donde se ha descrito la expresión de la mayoría de los subtipos conocidos, participan en fenómenos de plasticidad sináptica, liberación de neurotransmisores y en la regulación de procesos de neurodegeneración y neuroregeneración.

1.6. Receptores ionotrópicos P2X.

Los receptores P2X son canales iónicos insertados en la membrana plasmática activados por la unión del ATP extracelular y que permiten el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño (Na⁺, K⁺ y Ca²⁺) (Khakh and North, 2012; North, 2002). Se expresan en todo el organismo, mediando multitud de procesos que van desde la transmisión sináptica hasta la coagulación sanguínea. Tienen un papel destacado en la transmisión sináptica rápida entre neuronas y en la transmisión neuromuscular en el músculo liso, donde el ATP actúa como neurotransmisor principal (Edwards et al., 1992; Sneddon et al., 2000). Hasta la fecha se han clonado y caracterizado siete subunidades P2X diferentes, denominadas de P2X1 a P2X7 (Nicke et al., 1998; Vial et al., 2004). El descubrimiento de nuevas isoformas de estas subunidades ha aumentado

la diversidad de esta familia de receptores. Este es el caso, por ejemplo, de las isoformas identificadas como consecuencia del procesamiento alternativo del receptor P2X₂ en cerebelo de rata, cóclea y pituitaria (Housley et al., 1998; Lynch et al., 1999; Simon et al., 1997). Aunque la mayoría de las variantes no son capaces de formar canales activos por sí mismas, su expresión en los tejidos pone de manifiesto la posibilidad de que la heterogeneidad de los receptores P2X *in vivo* sea mayor de la esperada, y podría explicar algunas de las diferencias existentes entre las propiedades de los receptores endógenos y los expresados heterológicamente.

1.6.1. Características estructurales y oligomerización.

Los receptores P2X constituyen una familia estructuralmente diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando (North, 1996). Las subunidades P2X varían entre los 379 aa del receptor P2X₆ a los 595 del P2X₇. Poseen extremos amino y carboxilo citosólicos y dos regiones transmembrana (TM1 y TM2), de las cuales la primera está involucrada en la apertura del canal y la segunda en la formación del

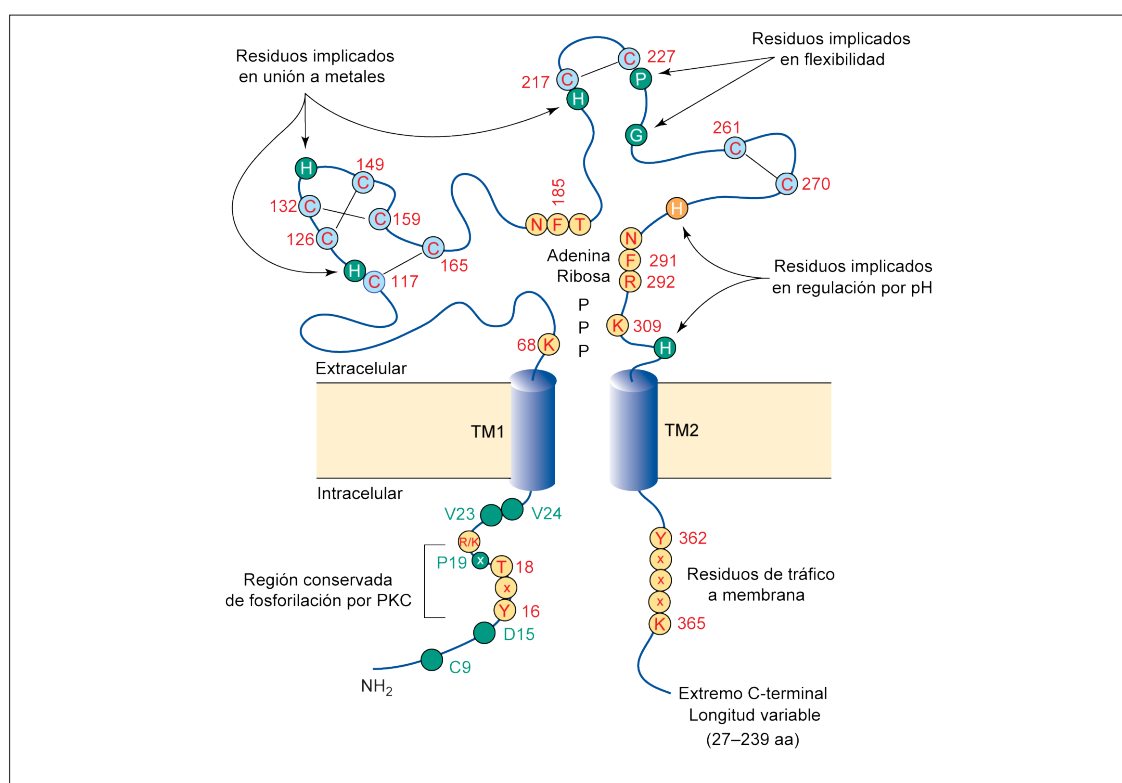


Figura 2. Modelo estructural de las subunidades P2X. Se muestran los extremos C y N-terminal, el dominio extracelular y los dominios transmembrana (TM1 y TM2). Los aminoácidos conservados se muestran en rojo, mientras que los verdes o naranjas corresponden a los aminoácidos identificados por mutagénesis en P2X₂ y P2X₄. Se muestra la región conservada de interacción con PKC en el extremo N-terminal y la región presente en el extremo C-terminal, de longitud variable, que está implicada en el transporte a membrana. Igualmente aparecen indicados los aminoácidos implicados en el reconocimiento de ATP, regulación por pH, por metales o en los cambios conformacionales del receptor (flexibilidad). Esquema modificado de Vial y cols, 2004 (Vial et al., 2004).

mismo (Figura 2). Parece que la interacción entre los dos segmentos transmembrana de las subunidades P2X también puede modular la apertura y cierre del canal (Haines et al., 2001; Werner et al., 1996). El extremo amino tiene un tamaño uniformemente corto en todas las subunidades (24-31 aa) y participa directamente en la regulación de la conductividad iónica a través de estos canales (Boue-Grabot et al., 2000; Ennion and Evans, 2002; Liu et al., 2003). Por el contrario, el extremo carboxilo es muy variable en secuencia y tamaño: muy corto en los receptores P2X1, 3, 4 y 6, intermedio en los P2X2 y 5 e inusualmente grande en la subunidad P2X7, con más de 200 aa y un dominio hidrofóbico adicional (Figura 3). Este hecho sugiere que el extremo carboxilo podría conferir propiedades específicas a cada receptor. La región C-terminal presenta en todas las isoformas un motivo YxxxxK conservado cercano al TM2 que parece estar asociado al correcto transporte del receptor a la membrana y a la estabilización de su expresión en la superficie celular (Bobanovic et al., 2002; Chaumont et al., 2004). Además, estudios de mutagénesis sugieren que también puede estar relacionado con la regulación de la apertura del canal y con las propiedades del poro de estos receptores (Eickhorst et al., 2002). Por otro lado, entre el 50 y el 70% de la estructura de estas subunidades está contenido en un bucle extracelular situado entre los dos segmentos transmembrana. Posee alrededor de 280 aa, 93 de los cuales se encuentran altamente conservados en, al menos, seis de las subunidades P2X (Vial et al., 2004). Mediante técnicas de cristalografía se ha encontrado lo que parece ser el sitio de unión del ligando, ya que existe un espacio para la unión de tres moléculas de ATP en la interfase de cada uno de los tres pares de subunidades que conforman el receptor trimérico. El ATP es reconocido a través de interacciones hidrofílicas (Hattori and Gouaux, 2012). El dominio extracelular de los receptores cuenta también con numerosos sitios de glicosilación implicados en la inserción de las proteínas en la membrana plasmática y en la afinidad por el ligando (Hu et al., 2002; Rettinger et al., 2000; Torres et al., 1998).

Los dos segmentos transmembrana que presentan las subunidades P2X no son capaces por sí solos de formar un poro iónico, lo que sugiere que las distintas subunidades deben asociarse para formar un canal funcional. Este poro o canal iónico está formado por la agrupación de tres subunidades generando canales homo- o heterotriméricos (Figura 3) (Aschrafi et al., 2004; Nagaya et al., 2005; Nicke et al., 1998). El ensamblaje no se produce aleatoriamente entre cualquier subunidad P2X. Hasta la fecha se han descrito las siguientes combinaciones de receptores heteroméricos: P2X1/P2X2, P2X1/P2X4, P2X1/P2X5, P2X2/P2X3, P2X2/P2X6, P2X4/P2X6 y P2X2/P2X5 (Abbracchio et al., 2009; Compan et al., 2012; Roberts et al., 2006). La capacidad de heteromerización de la subunidad P2X7 no se conoce con exactitud. Durante mucho tiempo se pensó que

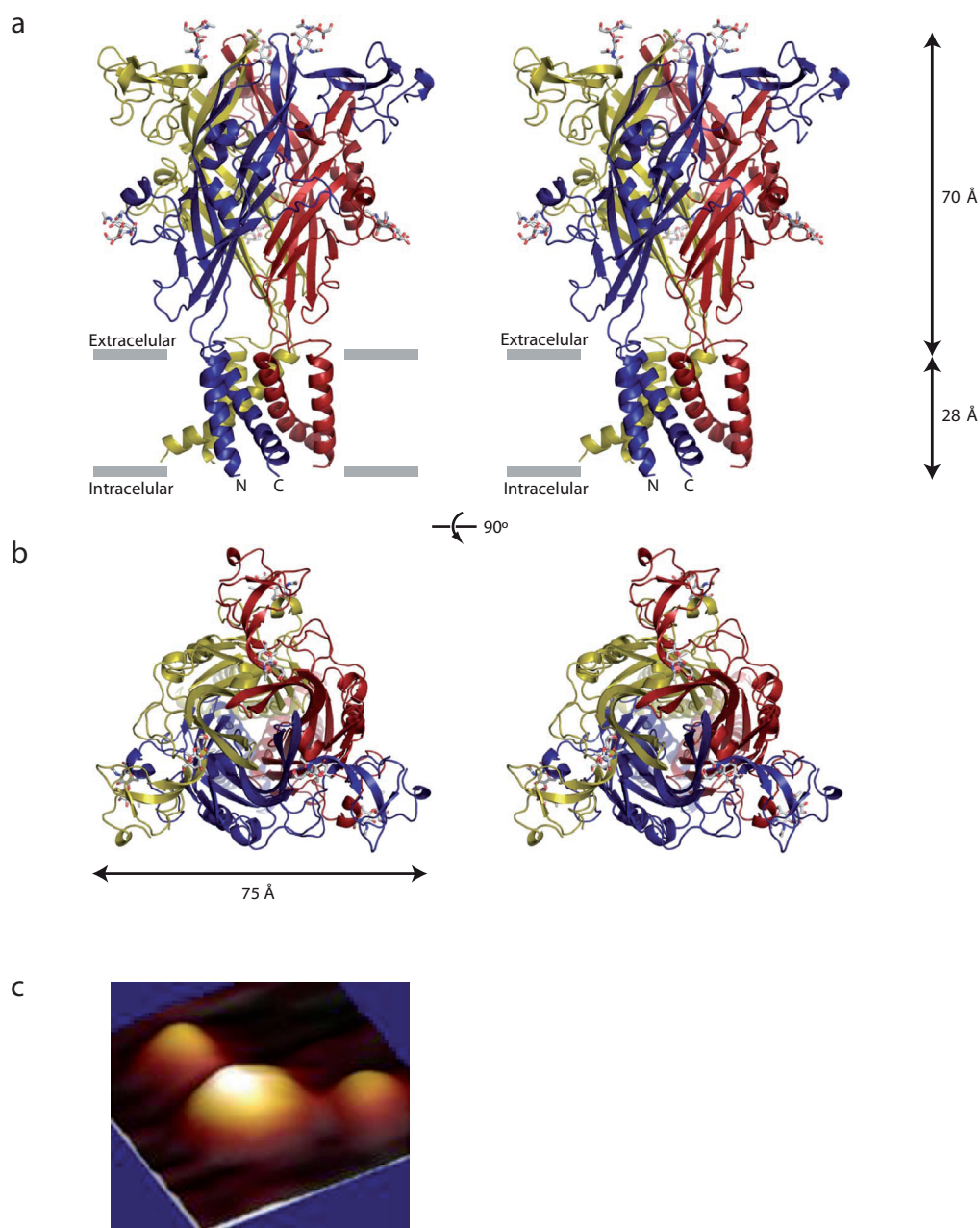


Figura 3. Arquitectura de los receptores P2X. (A) Vista de un homotrímero en paralelo a la membrana plasmática. Cada subunidad está representada en un color diferente. (B) Vista en perpendicular desde el lado extracelular de la membrana. Adaptado Kawate y cols., 2009 (Kawate et al., 2009). (C) Imagen de microscopía electrónica tomada de la página web del departamento de farmacología de la Universidad de Cambridge muestra un receptor P2X2 unido a dos moléculas de anticuerpo específicas para este receptor (más pequeñas). El ángulo formado entre las dos moléculas de anticuerpo y el receptor es de 120° lo que indica que el receptor está formado por 3 subunidades.

únicamente formaba parte de canales homoméricos. Posteriormente se propuso que podía constituir heterómeros funcionales con la subunidad P2X4 (Guo et al., 2007), pero estudios más recientes han desmentido esta hipótesis porque los receptores heteroméricos P2X4/P2X7 no son demasiado estables y no representan un porcentaje significativo en los modelos estudiados (Nicke, 2008).

1.6.2. Propiedades farmacológicas.

Las herramientas farmacológicas disponibles a la hora de discriminar entre los diferentes receptores P2X son limitadas y en muchos casos los mismos agonistas y antagonistas pueden actuar tanto sobre receptores P2X como P2Y. En general, siguiendo criterios estrictamente farmacológicos se pueden distinguir dos grandes grupos dentro de la familia de los receptores P2X. Por un lado el grupo formado por los receptores P2X1 y P2X3 que se caracteriza por su elevada afinidad por el ATP ($EC_{50} \approx 0,1 \mu M$) y por ser activados por el análogo sintético α, β -meATP. Estos receptores también se caracterizan por sufrir una desensibilización rápida (menos de 1 s de exposición al ATP) y una recuperación muy lenta tras la desensibilización. El segundo grupo, que engloba al resto de receptores P2X, se caracteriza por una menor afinidad por ATP, por su insensibilidad al α, β -meATP (excepto el P2X6) y por sufrir una desensibilización menos marcada (Coddou et al., 2011; Gever et al., 2006; North, 2002). Las curvas de dosis-respuesta para los receptores P2X expresados en sistemas heterólogos muestran valores de afinidad para el ATP muy variables, desde concentraciones submicromolares en el caso de los receptores P2X1 y P2X3 hasta el micromolar bajo en el caso de los receptores P2X2, 4 y 6, siendo el receptor P2X7 el que presenta una menor afinidad con un valor de EC_{50} de 400 μM (Gever et al., 2006; North, 2002). Otros nucleósidos trifosfato (CTP, GTP) pueden actuar sobre diversos subtipos de receptores P2X, pero con menor potencia que el ATP, como es el caso del CTP que se comporta como una agonista parcial del receptor P2X4 (Garcia-Guzman et al., 1997). Existen también una serie de análogos sintéticos, como el ya mencionado α, β -meATP, que permiten discriminar entre algunos subtipos de receptores P2X. Como se ha comentado previamente, la falta de selectividad entre los diferentes subtipos de receptores purinérgicos no es exclusiva de los agonistas, ya que los antagonistas más utilizados (suramina y PPADS) bloquean la mayoría de los receptores P2X y, en el caso de la suramina, también muchos P2Y. En la Tabla 1 se resumen los principales agonistas y antagonistas empleados en la caracterización farmacológica de los receptores homoméricos P2X, así como sus afinidades por el ATP, su modulación por iones divalentes o pH y su distribución tisular.

1.6.3. Características funcionales y regulación de los receptores P2X.

Las características funcionales de los receptores P2X dependen de las subunidades que componen el canal y es muy usual que en el mismo tejido o tipo celular se coexpresen diversas subunidades dificultando el estudio de las mismas, por lo que normalmente se utilizan sistemas heterólogos de expresión para analizar

Tabla 1. Clasificación de los receptores P2X homoméricos. Los datos reflejados en la tabla corresponde a receptores P2x de mamífero y han sido obtenidos de (Burnstock, 2007; Coddou et al., 2011; Chambers et al., 2010; Donnelly-Roberts et al., 2009; Illes and Alexandre Ribeiro, 2004; Khakh et al., 2001; King BF, 2003; Norenberg and Illes, 2000; North, 2002).

Receptor	EC ₅₀ (ATP)	Potencia de agonistas (EC ₅₀)	Antagonistas (IC ₅₀)	Modulación por iones	Desensibilización	Distribución mayoritaria
P2X1	0,1 μM	ATP=2MeSATP≥Ap ₆ A≥ α,β-meATP>BzATP>Ap ₅ A	NF449>Ip ₅ I>TNP-ATP>Ip ₅ I >MRS2159>PPADS (rango nM) Suramina= PPADS (rango μM)	H ⁺ ↓ Zn ²⁺ ↓ Cd ²⁺ ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, músculo liso, plaquetas, ganglios simpáticos
P2X2	5 μM	2MeSATP≥ATP ≥>Ap ₄ A>ATP _γ S>BzATP ADP inactivo	RB 2=NF279=PPADS>Suramina (rango μM) NF770>NF776>NF778	H ⁺ ↑ Zn ²⁺ ↑ Cu ²⁺ ↑ Ca ²⁺ ↓	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, células cromafines, músculo liso, retina
P2X3	1,3 μM	2MeSATP≥ATP= α,β-meATP>Ap ₅ A>ADP	TNP-ATP>MRS2257=A317491> MRS2159=PPADS (rango nM) NF279=NF449>Ip ₅ I≥Suramina>NF023>R B 2 (rango mM) A317491, NF110, rojo fenol	Zn ²⁺ ↑ H ⁺ ↓ Ca ²⁺ ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, neuronas sensoriales
P2X4	4 μM	ATP>2MeSATP α,β-meATP y ADP inactivos Potenciación por Ivermectina, Propofol y Cibacron blue	TNP-ATP>BBG (rango μM) fenoltaleína	H ⁺ ↓ Zn ²⁺ ↑	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, testículos, colon
P2X5	0,4 μM	ATP=2MeSATP=Ap ₄ A> α,β-meATP y ADP inactivos	PPADS>TNP-ATP>Suramina> RB 2 (rango μM)	Zn ²⁺ ↑ H ⁺ , Ca ²⁺ ↓	Lenta	Ganglio del trigémino, médula espinal, células proliferativas de la piel, timo, vejiga
P2X6	0,6 μM	2MeSATP>ATP=α,β-meATP ADP inactivo	TNP-ATP> PPADS Insensible a Suramina	H ⁺ , Ca ²⁺ ↓ Zn ²⁺ ↑	Lenta	Ganglios simpáticos, cerebro, médula espinal
P2X7	400 μM	BzATP>>ATP 2MeSATP> αβ-meATP=βγ-meATP ATPgS y ADP inactivos	A-740003 ≥ A-438079 (rata, humano) BBG (rango nM) (rata) PPADS=TNP-ATP (rango nM) KN-62 (rango nM) (humano) A804598=AZ11645373 (rango nM)	H ⁺ ↓ Mg ²⁺ ↓ Cu ²⁺ ↓ Zn ²⁺ ↓ Ca ²⁺ ↓	Lenta	Ganglios de retina y cóclea, células inmunes, cerebro, médula espinal, páncreas y piel.

los patrones de respuesta de los diferentes receptores recombinantes (North, 2002). De este modo, los receptores P2X se han caracterizado y clasificado en función de su afinidad por diversos agonistas y antagonistas, la cinética de la respuesta de calcio y su modulación por cationes divalentes o pH (Tabla 1). En los receptores heteroméricos las características funcionales pueden venir determinadas por una de las subunidades que lo compone, por la combinación de las características de las distintas subunidades integrantes del receptor, o bien pueden presentar características funcionales completamente nuevas como sucede en el caso del heterotrímero P2X2/P2X5 que exhibe propiedades funcionales que hasta ahora parecían distintivas del receptor P2X7 (Compan et al., 2012).

La unión del ATP produce un cambio conformacional que llega a modificar la posición de los segmentos transmembrana, produciendo así la apertura del canal (Hattori and Gouaux, 2012). Una vez activados, se produce la entrada rápida (milisegundos) y no selectiva de cationes divalentes Ca^{2+} , Na^{+} o K^{+} , siendo además el receptor P2X5 permeable al Cl^{-} (Bo et al., 2003). La permeabilidad relativa para cada uno de estos iones varía en función de la subunidad P2X implicada, aunque también puede modificarse dependiendo de su regulación. La principal consecuencia de la activación de los receptores P2X es un incremento transitorio en la concentración intracelular de calcio libre que despolariza la membrana celular. Dependiendo del subtipo de receptor P2X implicado, dicha despolarización será más o menos prolongada en el tiempo. Como ya se ha mencionado los receptores P2X1 y P2X3 son los que más rápido se desensibilizan, en 1-2 segundos, mientras que las respuestas mediadas por el resto de los receptores P2X son mucho más sostenidas en el tiempo. El ejemplo más drástico es el del receptor P2X7 que puede permanecer activado durante minutos en presencia del agonista (North, 2002). En células neuronales, la despolarización inducida por la entrada de calcio a través de los receptores P2X facilita la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, produciéndose un incremento significativo en los niveles de calcio citosólico libre. Posteriormente, este incremento de calcio intracelular activará, dependiendo del tipo neuronal, diferentes cascadas de señalización que pueden implicar la regulación de proteínas quinasas como la Ca^{2+} -calmodulina quinasa II (CaMKII) (Leon et al., 2006), las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la proteína quinasa C (PKC) (Erb et al., 2006) o la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Diaz-Hernandez et al., 2008; Ortega et al., 2009); así como la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina (Diaz-Hernandez et al., 2002), el glutamato (Gualix et al., 2003) o el GABA (Gomez-Villafuertes et al., 2001).

Los receptores P2X están modulados alostéricamente por protones extracelulares, cationes divalentes y varios metales, como el Cu^{2+} y el Zn^{2+} , aunque como se indica en la tabla 1 las consecuencias y los residuos implicados en cada caso varían entre los diferentes tipos de receptores P2X (North, 2002). A su vez, los receptores P2X pueden ser modulados a través de diversas modificaciones de sus dominios intracelulares. Por ejemplo, la fosforilación por PKC de determinados residuos de serina en el dominio N-terminal es capaz de regular la desensibilización del receptor P2X2 (Boue-Grabot et al., 2000). Otro residuo implicado en la regulación es la Tyr343, que se encuentra en la zona de transición entre el TM2 y el dominio C-terminal del receptor P2X7. Su defosforilación tras la activación del canal lleva a una reducción de la duración de la respuesta (Becker et al., 2008).

1.7. El receptor P2X7.

Como se ha mencionado previamente, el receptor P2X7 se considera un receptor atípico porque requiere concentraciones de ATP más elevadas que el resto de las subunidades P2X para ser activado y porque posee un extremo carboxilo extremadamente largo que alcanza los 240 aa y posee numerosas secuencias para la interacción con otras proteínas (North, 2002; Surprenant et al., 1996). Originalmente fue clonado de plaquetas y se denominó receptor P2Z. Hasta la fecha se han identificado 8 procesamiento alternativos y numerosos polimorfismos del receptor P2X7 (Feng et al., 2006; Ferrari et al., 2006). En el gen *P2RX7* humano se han descrito más de 815 polimorfismos de nucleótido único (SNPs), pero sólo a algunos de ellos se les ha atribuido pérdida o ganancia de función del receptor (Cabrini et al., 2005; Eslick et al., 2009; Gu et al., 2004; Gu et al., 2001; Shemon et al., 2006; Skarratt et al., 2005; Stokes et al., 2010; Sun et al., 2010; Wiley et al., 2003) (Figura 4). Dentro de la región promotora se han identificado 5 SNPs, aunque hasta la fecha ninguno de ellos está asociado con un fenotipo específico de respuesta (Li et al., 2002). Aunque la mayoría de estas variantes no son funcionales por sí mismas, su presencia junto con otras subunidades puede alterar la función de otros receptores o dar lugar a un fenotipo diferente (Feng et al., 2006).

1.7.1. Propiedades farmacológicas.

La propiedad farmacológica diferencial del receptor P2X7 es su baja afinidad por el agonista fisiológico el ATP, con un valor de EC_{50} de 400 μM (Gever et al., 2006; North, 2002). El agonista no fisiológico más potente con el que se cuenta hasta la fecha es el análogo sintético 2'(3')-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP (BzATP) que se une al receptor

con una afinidad de 10 a 30 veces superior a la del ATP (Gever et al., 2006; Young et al., 2007). Sin embargo el BzATP no es selectivo para el receptor P2X7 ya que es de 100 a 1000 veces más potente como agonista de los receptores P2X1 y P2X3 (Bianchi et al., 1999). Es importante destacar que la afinidad de los receptores P2X por los diferentes agonistas o antagonistas puede variar entre las distintas especies (Young et al., 2007). Por ejemplo, el receptor P2X7 presenta una afinidad por los agonistas ATP y BzATP 10 veces superior en humano y rata que en ratón. También es característico de este receptor la potenciación de sus respuestas ante una reducción de cationes divalentes en el medio extracelular (Surprenant et al., 1996). Esta observación parece indicar que, o bien es la forma ATP^{4-} el ligando realmente activo de este receptor, o que los cationes divalentes son capaces de inhibir al receptor P2X7 alostéricamente (Liu et al., 2008; Virginio et al., 1997).

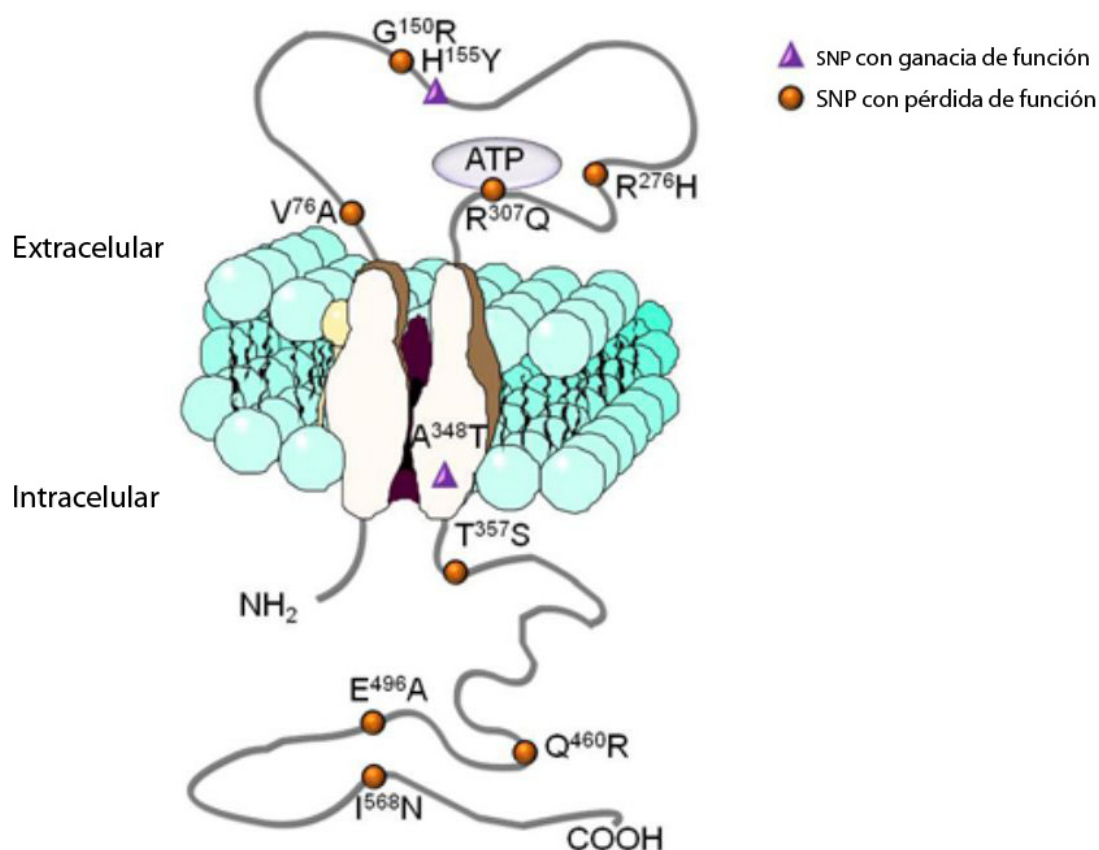


Figura 4. Dibujo esquemático de la estructura del receptor P2X7 mostrando los sitios de los SNPs caracterizados funcionalmente y los aminoácidos implicados.

Los antagonistas de los receptores P2X más ampliamente utilizados, la suramina y PPADS, bloquean el receptor P2X7 con baja afinidad y de forma no competitiva (Jacobson et al., 2002). El Brilliant Blue G (BBG) es un antagonista más potente y selectivo sobre el receptor P2X7, sobre todo en rata ($\text{IC}_{50} \approx 10\text{-}15 \text{ nM}$) y en ratón ($\text{IC}_{50} \approx 100 \text{ nM}$), mientras que en humano su efectividad es mucho menor ($\text{IC}_{50} \geq 10 \text{ }\mu\text{M}$)

(Gever et al., 2006; Jiang et al., 2000; Young et al., 2007). Se une al receptor por un sitio diferente al del ATP y se disocia de él muy lentamente (Michel et al., 2007). Otros antagonistas como la isoquinolina 1-[N,O-bis(5-isoquinolinasulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina (KN-62), conocido previamente como inhibidor de la CaMKII, tienen un efecto variable dependiendo de la especie: bloquea el receptor P2X7 humano de forma no competitiva a concentraciones nanomolares, pero es inactivo sobre el receptor P2X7 de rata (Gargett and Wiley, 1997; Humphreys et al., 1998). Dado que el receptor P2X7 está presente en células del sistema inmune, así como en la glía reactiva, donde parece jugar un papel importante en los procesos de inflamación y dolor, en los últimos años las empresas farmacéuticas se han esforzado en desarrollar nuevos antagonistas potentes y selectivos de este receptor con vista a su aplicación terapéutica. En 2006 los laboratorios Abbott generaron dos nuevos antagonistas selectivos que bloquean a concentraciones de nanomolar alto y de forma competitiva tanto el receptor P2X7 de rata como el humano. Estos compuestos son el tetrazol A-438079 y la cianoguanidina A-740003 y poseen actividad antinociceptiva y antiinflamatoria (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007; Honore et al., 2006; McGaraughty et al., 2007; Nelson et al., 2006). La Figura 5 muestra la estructura de los principales agonistas y antagonistas empleados en la caracterización farmacológica del receptor P2X7 (revisión (North and Jarvis, 2012)).

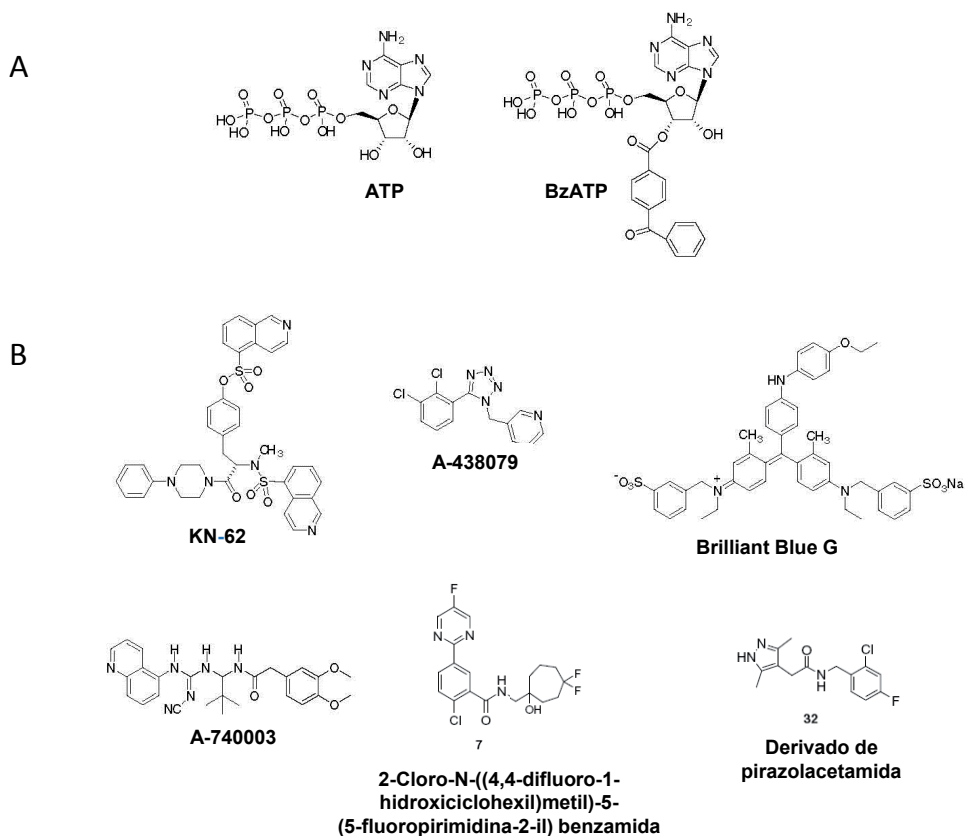


Figura 5. Estructura química de algunos de los agonistas (A) y antagonistas (B) más utilizados en la caracterización farmacológica de los receptores P2X7.

1.7.2. Características funcionales.

Tras una breve exposición al agonista (menos de 10 segundos) se produce una apertura rápida y reversible del receptor P2X7 que desencadena una serie de respuestas celulares como la activación de la caspasa-1, la liberación de interleuquina-1 β (IL-1 β), la proliferación celular o la apoptosis, dependiendo del tipo celular en el que se encuentre (Ferrari et al., 2006; Kahlenberg and Dubyak, 2004; North, 2002; Verhoef et al., 2003). P2X7 es el receptor P2X que menos se desensibiliza y se puede mantener activado en presencia de ATP o BzATP durante minutos (North, 2002). Además, las activaciones de larga duración a veces van acompañadas de incrementos en la amplitud de la corriente (North, 2002; Surprenant et al., 1996; Virginio et al., 1997). La activación de los receptores P2X7, y la consecuente entrada de calcio al interior celular, también se ha asociado con otras vías de señalización en las que participan la fosfolipasa D (PLD) (Humphreys and Dubyak, 1996), NF- κ B (Ferrari et al., 1997), GSK-3 (Diaz-Hernandez et al., 2011; Ortega et al., 2009; Ortega et al., 2010) y las MAPK (Aga et al., 2002). Diversos estudios demuestran que las diferentes MAPK afectadas por la activación del receptor P2X7 varían dependiendo del modelo de estudio. Por ejemplo, en células de astrocitoma humano la activación del receptor P2X7 recombinante produce un incremento en la fosforilación de la quinasa reguladora de señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) (Gendron et al., 2003), mientras que no ocurre así en una línea monocítica humana diferenciada (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007). Además, el aumento en los niveles de calcio citosólico es crucial para la liberación de neurotransmisores en un proceso dependiente de calmodulina. En esta cascada de señalización, el calcio activa la calmodulina que activa, a su vez, la CaMKII. Esta quinasa fosforila la sinapsina de la superficie de las vesículas sinápticas, provocando la liberación de las vesículas del citoesqueleto de modo que puedan fusionarse con las zonas activas de la terminal presináptica y liberar así su contenido al espacio sináptico (Leon et al., 2006; Lin et al., 1990). El receptor P2X7 también es capaz de inducir la activación de otras quinasas en un proceso independiente de la entrada de calcio, como por ejemplo la activación de la proteína quinasa D (PKD) en astrocitos de rata en cultivo (Carrasquero et al., 2010). Por último, la estimulación del receptor es capaz de inducir su propio reciclaje en un proceso dependiente de la fosforilación de la quinasa de GPCR tipo 3 y de la internalización del receptor en dominios de dinamina y clatrina mediada por β -arrestina-2 (Feng et al., 2005).

1.7.3. Papel del receptor P2X7 en el Sistema Nervioso.

El receptor P2X7 se localiza en una gran variedad de tejidos y se asocia a múltiples funciones. Inicialmente se clonó en macrófagos y se identificó en una gran variedad de células del sistema inmune, incluyendo linfocitos B y T, monocitos, eritrocitos, macrófagos, microglía y también en osteoclastos (Burnstock, 2013; Burnstock and Knight, 2004). Durante mucho tiempo se postuló que el receptor P2X7 estaba ausente en las neuronas, siendo expresado únicamente por células no neurales del SNC como la microglía y la astrogliá (Collo et al., 1997). Estudios recientes utilizando técnicas de hibridación *in situ* y análisis por RT-PCR han permitido detectar la presencia del ARNm del receptor P2X7 en diversas áreas del SNC como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la médula espinal, el cerebelo, el estriado, el tálamo, el hipotálamo y el hipocampo (Yu et al., 2008). Además, cada vez son más los trabajos que ponen de manifiesto la funcionalidad de estos receptores en neuronas (Alloisio et al., 2008; Deuchars et al., 2001; Diaz-Hernandez et al., 2008; Hervas et al., 2003; Hervas et al., 2005; Leon et al., 2006; Marin-Garcia, 2007; Marin-Garcia et al., 2008; Miras-Portugal et al., 2003; Sanchez-Nogueiro et al., 2009; Sanchez-Nogueiro et al., 2005). Cabe destacar la significativa presencia del receptor P2X7 en las terminales nerviosas del SNC, dado que más del 50% de éstas presentan un marcaje positivo con anticuerpos frente a dicha subunidad. También se han detectado incrementos de calcio presinápticos tras la estimulación con agonistas específicos del receptor P2X7 (Hervas et al., 2005; Miras-Portugal et al., 2003). Esta localización tan específica apoya una de las funciones más importantes de los receptores P2X que es la regulación de la secreción de neurotransmisores como el glutamato o el GABA (Atkinson et al., 2004; Leon et al., 2008; Papp et al., 2007; Sperlagh et al., 2007). Por otra parte, la inhibición de los receptores P2X7 presentes en el cono de crecimiento de las neuronas en desarrollo se asocia a un mayor crecimiento y ramificación de axon (Diaz-Hernandez et al., 2008).

A nivel somático, la activación del receptor P2X7 en neuronas granulares de cerebelo de rata se asocia a una mayor supervivencia neuronal frente a determinados estímulos proapoptóticos (Ortega et al., 2009; Ortega et al., 2010). Los receptores P2X7 también están involucrados en procesos neurodegenerativos regulando la concentración intracelular de calcio, la liberación y procesamiento de la IL-1 β , la activación de caspasas y la secreción de glutamato en condiciones patológicas como la inflamación, el daño mecánico, la isquemia y el estrés (Chessell et al., 2005; Le Feuvre et al., 2002; Solle et al., 2001; Sperlagh et al., 2006). En pacientes afectados de Alzheimer, así como en modelos murinos de dicha enfermedad, la expresión del receptor P2X7 en

cerebro se encuentra incrementada alrededor de las placas amiloides, en los astrocitos y en la microglía activada. Esta última, media la producción de peróxido de hidrógeno que contribuye a la neurodegeneración en los modelos animales de dicha enfermedad (McLarnon et al., 2006; Parvathenani et al., 2003). Estudios *in vitro* han demostrado que la inhibición del receptor P2X7 aumenta la actividad del enzima α -secretasa mediante la inhibición de GSK-3. Además, la inhibición *in vivo* del receptor P2X7 en ratones transgénicos que contienen una mutación en la proteína precursora amiloide (APP) humana reduce significativamente el número de placas amiloides en el hipocampo, al disminuir la actividad de la GSK-3 y favorecer el procesamiento proteolítico de la APP por la α -secretasa (Diaz-Hernandez et al., 2011). También se ha descrito un papel relevante del receptor P2X7 en la enfermedad de Huntington donde se han encontrado elevados niveles de expresión del receptor y un funcionamiento alterado. La administración de antagonistas del receptor P2X7 en modelos animales de Huntington previene la apoptosis neuronal y atenúa la pérdida de peso y el déficit motor que sufren estos animales, sugiriendo que la alteración de receptor P2X7 contribuye a la patogénesis de dicha enfermedad (Diaz-Hernandez et al., 2009). Además la inhibición farmacológica del receptor P2X7 se asocia a una recuperación terapéutica de numerosas situaciones patológicas (Sperlagh et al., 2006) como lesiones medulares (Wang et al., 2004), inflamación y dolor neuropático (Chessell et al., 2005; McGaraughty et al., 2007), así como lesiones en la retina (Franke et al., 2005), (revisión (Burnstock et al., 2011)).

2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS.

2.1. Fundamentos generales.

Dado el elevado coste de la síntesis de proteínas, la regulación de la expresión génica es esencial para conseguir una utilización óptima de la energía disponible. Existen genes constitutivos cuya expresión se requiere en todo momento y se expresan en un nivel más o menos constante en prácticamente todas las células de un organismo y existen otros genes cuya expresión es regulada y varían su nivel de expresión en respuesta a señales moleculares. De los aproximadamente 35000 genes estimados en el genoma humano, solamente se expresa una fracción muy pequeña en una célula y en un momento dado. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario algunas proteínas que influyen en la diferenciación celular están presentes solamente un breve lapso de tiempo y sólo en algunos tipos celulares.

El inicio de la transcripción es un punto de regulación fundamental en la expresión génica en eucariotas. La transcripción está facilitada y regulada por interacciones proteína-ADN, especialmente por aquellas en las que intervienen los componentes proteicos de las ARN polimerasas. En eucariotas, el estado transcripcional de la mayoría de los genes es restrictivo, ya que la interacción entre la ARN polimerasa II y el ADN requiere de la presencia de proteínas reguladoras (Struhl, 1999). Además, el acceso de las proteínas reguladoras a los promotores se encuentra restringido por la estructura de la cromatina, de forma que las regiones de cromatina que van a ser transcritas deben eliminar determinadas “barreras” estructurales que impiden el acceso de las proteínas reguladoras a sus sitios de unión específicos en el ADN. En una célula eucariótica típica, alrededor del 10% de la cromatina se encuentra en un estado más condensado que el resto formando la heterocromatina, que es transcripcionalmente inactiva, y sólo una parte de la cromatina restante menos condensada, denominada eucromatina, es transcripcionalmente activa. El proceso de activación transcripcional de la cromatina se encuentra principalmente regulado por el grado de metilación del ADN y la acetilación de las histonas (Nelson, 2006).

El 40-50% de los genes de vertebrados se localizan cerca de secuencias ricas en dinucleótidos CG (denominadas islas CpG) y el estado de metilación de las citosinas de dichas secuencias determina el patrón de expresión del gen adyacente. En las células eucariotas, aproximadamente el 5% de los residuos de citosina son metilados en forma de 5-metilcitosina por las enzimas ADN metiltransferasas que transfieren un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina hasta la posición 5 de la citosina (Nelson, 2006; Phillips, 2008b). Actualmente se sabe que la metilación del ADN es una herramienta de señalización epigenética, término que hace referencia a los cambios heredables en la expresión de genes que no implican cambios en la secuencia (Ballestar and Esteller, 2008). Numerosos estudios muestran que la metilación próxima a algunos promotores se correlaciona con el silenciamiento de los genes codificados en las regiones adyacentes (Suzuki and Bird, 2008). Así en muchas células tumorales la hipermetilación de algunos promotores resulta en la pérdida de función de genes supresores de tumores y comienza a desarrollarse el proceso tumoral. Además, parece que la correcta metilación del ADN es esencial para la diferenciación celular y el desarrollo embrionario (Li et al., 1992; Okano et al., 1999).

Por otro lado la acetilación de las histonas tiene dos funciones principales, neutralizar la carga positiva de los residuos de lisina y desestabilizar las interacciones entre los extremos N-terminales de las histonas y otras proteínas estructurales no

histonas. En última instancia ambos procesos reducen la afinidad de las histonas por el ADN facilitando la accesibilidad de las proteínas reguladoras. La acetilación de las histonas también puede regular la interacción de éstas con otras proteínas implicadas en la transcripción (Rattray and Muller, 2012).

2.2. Proteínas reguladoras.

Estas proteínas se unen generalmente a secuencias de ADN específicas denominadas secuencias consenso. Sus afinidades por estas secuencias son aproximadamente de 10^4 a 10^6 veces mayores que sus afinidades por cualquier otra secuencia de ADN. Existen al menos tres tipos de proteínas que regulan el inicio de la transcripción: los factores de especificidad, los activadores y los represores (Phillips, 2008a):

- a) **Los factores de especificidad** modifican la especificidad de la ARN polimerasa por un promotor determinado o por un conjunto de promotores. En eucariotas, se consideran factores de especificidad los factores de transcripción basal como TBP (proteína de unión a la caja TATA). Normalmente la transcripción comienza cuando el factor de transcripción se une a su secuencia consenso iniciando una serie de interacciones con otras proteínas (activadores, coactivadores, represores...) formando un complejo de inicio que facilita la unión y la transcripción por la ARN polimerasa II.
- b) **Los activadores** se unen a sitios específicos en el ADN potenciando la interacción de la ARN polimerasa con el promotor. En eucariotas, algunos sitios de unión de los activadores se denominan potenciadores: están situados en posición 5' ó 3' con respecto al gen y pueden afectar a la transcripción incluso estando localizados a miles de pb del promotor. Los potenciadores son reconocidas por unas proteínas reguladoras denominadas transactivadores que se unen con muy alta afinidad a secuencias en el ADN, incluso con la cromatina condensada. La regulación por un activador que potencia la transcripción se denomina regulación positiva y en eucariotas es un tipo de regulación muy frecuente.
- c) **Los represores** se unen a sitios específicos en el ADN impidiendo el acceso de la ARN polimerasa al promotor. Se sitúan generalmente cerca de un promotor aunque en eucariotas el sitio de unión del represor puede estar lejos del promotor. Cuando el represor está presente se bloquea la unión de la ARN polimerasa o su movimiento a lo largo del ADN. Muy pocos genes eucariotas están regulados

por represores, aunque en ocasiones existen activadores que pueden adoptar múltiples conformaciones y actuar como activadores o represores transcripcionales dependiendo de las necesidades celulares (ej. algunos receptores de hormonas esteroideas).

La mayoría de las proteínas reguladoras tienen dominios de unión al ADN que contienen subestructuras que interaccionan específicamente con éste estableciendo puentes de hidrógeno. Para poder interaccionar con las bases del surco mayor del ADN, los dominios de unión a ADN de las proteínas reguladoras tienden a ser pequeños (de 60 a 90 aa) y los motivos estructurales dentro de estos dominios que están en contacto con el ADN son todavía más pequeños. Los sitios de unión del ADN para las proteínas son a menudo repeticiones invertidas de una secuencia de ADN corta a la que se unen cooperativamente múltiples subunidades (normalmente dos) de una proteína reguladora. Se han descrito varios motivos de unión al ADN, pero el que juega un papel fundamental en eucariotas es el dedo de zinc (Brayer and Segal, 2008). En este motivo, unos 30 aa forman un lazo alargado sujeto por su base por un único ion Zn^{2+} , coordinado con cuatro residuos (4 de cisteína o 2 de cisteína y 2 de histidina) donde el zinc no interacciona directamente con el ADN sino que la coordinación del catión con los aminoácidos estabiliza este pequeño motivo estructural (Figura 6A). Además, varias cadenas laterales hidrofóbicas en el núcleo de la estructura también contribuyen

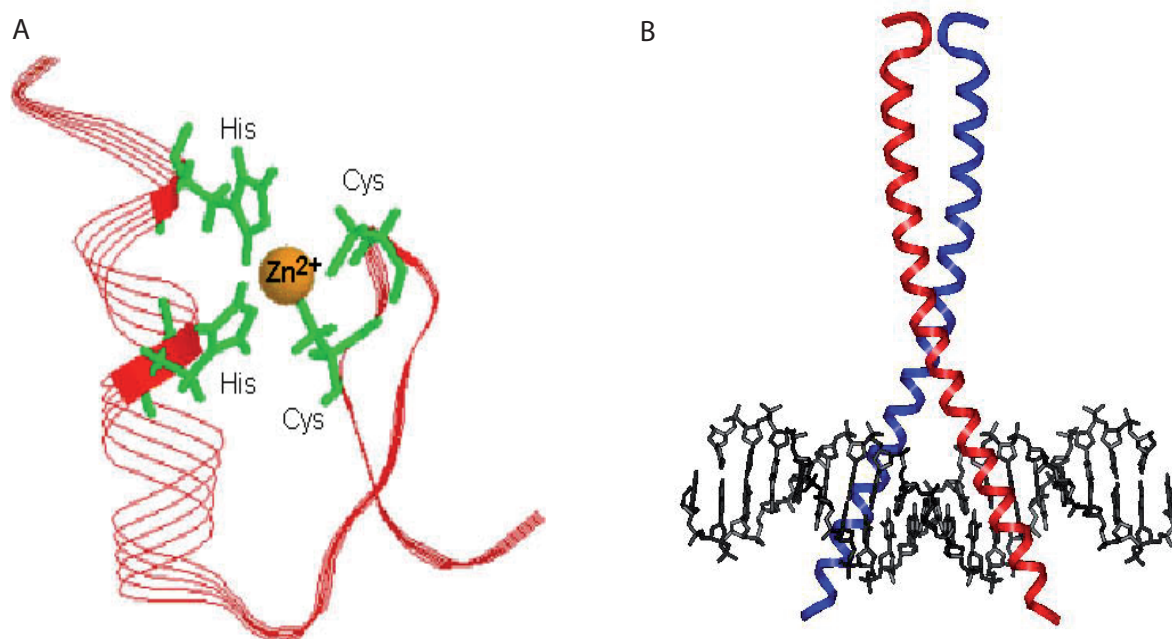


Figura 6. Motivos presentes en el factor de transcripción Sp1. (A) Estructura dedo de zinc. Dos residuos de cisteína y dos de histidina se coordinan con el catión de Zn^{2+} . (B) Motivo de unión proteína-proteína tipo cremallera de leucina.

a la estabilidad. La interacción de un único dedo de zinc con el ADN es débil y muchas proteínas que se unen al ADN tienen múltiples dedos de zinc que potencian la unión interaccionando simultáneamente con el ADN.

Las proteínas reguladoras también contienen dominios para la interacción entre proteínas, por ejemplo para la unión con la ARN polimerasa o con otras proteínas reguladoras. Además, algunos dominios estructurales están implicados en las interacciones necesarias para que las proteínas reguladoras constituyan dímeros funcionales previo a la unión al ADN. Frecuentemente los factores de transcripción que se unen al ADN mediante dominios de dedos de zinc, lo hacen en forma de dímeros funcionales enlazados mediante el motivo estructural denominado cremallera de leucina (Figura 6B) (Miller, 2009). Dicho dominio consta de 1 hélice α que contiene un residuo de leucina cada 7 aa, quedando las leucinas alineadas en el mismo lado de la hélice. Los residuos de leucina de ambas hélices establecen interacciones hidrofóbicas que hacen que las hélices se enrollen una alrededor de la otra. Las regiones N-terminales contienen hélices de reconocimiento del ADN ricas en residuos básicos (arginina o lisina) que interaccionan con los grupos fosfato con carga negativa del ADN.

2.3. Regulación transcripcional de los receptores P2X.

Para poder comprender el papel tanto fisiológico como patológico de los receptores P2X en el funcionamiento del organismo es importante conocer cómo se regula su expresión. Los niveles de proteína de estos receptores pueden influir en las propiedades del canal así como en las interacciones con otros receptores, por lo que es importante descubrir los mecanismos que subyacen la regulación de la expresión de estas proteínas. Como se describe a continuación, los escasos estudios de los que se dispone hasta la fecha parecen implicar de forma recurrente a determinados factores de transcripción como Sp1 en la regulación transcripcional de los receptores P2X.

2.3.1. Receptor P2X1.

El análisis de un fragmento de 4,7 Kb correspondiente a la región 5' flanqueante del gen *P2RX1* humano ha demostrado que su región promotora no contiene cajas TATA o CAAT convencionales, identificando el sitio de inicio de la transcripción (TSS) a 365 pb del codón de inicio ATG (Zhao and Ennion, 2006). Estudios realizados en megacariocitos humanos MEG-01 determinaron que aunque la actividad del promotor *P2RX1* en condiciones basales es muy reducida, en presencia de ésteres de forbol (que producen la diferenciación de esta línea celular) se produce un incremento muy significativo de

su actividad transcripcional. Un análisis detallado de la región 5' flanqueante puso en evidencia la existencia dos sitios de unión para Sp1 (denominados a partir de ahora sitios SP1) en las posiciones +44/+52 y +71/+79 y un sitio NF-I en la posición -24/-10. Estos sitios de regulación se han mantenido a lo largo de la evolución puesto que aparecen tanto en roedores como en humanos. Aunque la mutación del primer sitio SP1 no produce efecto alguno en la actividad transcripcional, la mutación del segundo sitio SP1 o del sitio NF-I reduce significativamente la actividad del promotor *P2RX1*. Curiosamente la eliminación simultánea de los ambos sitios SP1 abole por completo la actividad transcripcional, sugiriendo que ambos sitios participan en el mantenimiento de una expresión basal del receptor P2X1. Además la mutación combinada del segundo sitio SP1 y NF-I también abole por completo la actividad del promotor, indicando que pueden actuar sinérgicamente en el reclutamiento del complejo de iniciación.

2.3.2. Receptor P2X2.

El análisis de la región promotora del gen *P2rx2* de rata ha permitido identificar tres elementos cuyas secuencias coinciden con la canónica para el elemento de respuesta al ácido retinoico (RARE) compuesta por dos repeticiones directas de motivos hexanucleotídicos [(A/G)G(G/T)TCA] separadas por uno (DR1 -2309/-2321), cuatro (DR4 -2299/-2314) o cinco nucleótidos (DR5 -2408/2424). Además se ha demostrado que el ligando natural, el ácido 9-*cis*-retinoico (9-*cis*-RA), un derivado de la vitamina A, incrementa la expresión del receptor P2X2 a nivel transcripcional en el modelo neuronal de células PC-12. Los efectos transcripcionales del 9-*cis*-RA están mediados por la activación de dos familias de receptores nucleares: los receptores del ácido retinoico (RARs) y el receptor X retinoide (RXR). El RXR puede formar tanto homodímeros como heterodímeros con otros receptores nucleares tales como el receptor de la hormona tiroidea, el receptor de la vitamina D y los RARs. Los heterodímeros RXR/RAR son activados específicamente por el ácido all-*trans*-retinoico (atRA) y pueden unirse a elementos RARE en el ADN. En el caso del receptor P2X2 se desconoce si los receptores RARs y RXR se unen directamente a la región promotora del gen, pero se ha demostrado que las células PC-12 tratadas con atRA muestran un incremento en los niveles del ARNm y proteína de la subunidad P2X2, mientras que el PA024, un agonista del RXR, no produce ningún efecto (Tozaki-Saitoh et al., 2006).

Los heterodímeros RXR/RAR generalmente se unen a sitios DR1 RARE y DR5 RARE (Kurokawa et al., 1994), mientras que a los sitios DR4 se unen RXR que heteromerizan con receptores nucleares diferentes a los RARs (Aranda and Pascual,

2001). Ensayos de actividad luciferasa confirmaron que el fragmento que contiene los elementos RARE es sensible al tratamiento con retinoides y que la delección de dichos elementos bloquea las actividades transcripcionales mediadas por 9-*cis*-RA y *atRa*, reduciendo también la actividad transcripcional basal del fragmento clonado. Estas evidencias indican que los heterodímeros RXR/RAR se unen a los sitios DR1 y DR5 RARE en el promotor del gen *P2rx2* de rata para activar la maquinaria de transcripción en respuesta al ácido retinoico. Dado que la principal función de los receptores P2X2 en el SNC es incrementar la liberación de neurotransmisores (Khakh et al., 2003), resulta interesante que en las células PC-12 la presencia de 9-*cis*-RA incrementa la liberación de dopamina mediada por la activación del receptor P2X2. Este dato sugiere que los retinoides pueden incrementar los efectos sinápticos del ATP sobre la modulación de la liberación de neurotransmisores a nivel neuronal mediante la regulación transcripcional de los receptores P2X2. Además de los tres elementos RARE, un análisis *in silico* de la región promotora del gen *P2rx2* ha mostrado la existencia de secuencias consenso para diversos factores de transcripción como Sp1, AP-1, AP-2, GATA-1, NF- κ B y CREB (Tozaki-Saitoh et al., 2006).

2.3.3. Receptor P2X4.

En el caso del gen *P2RX4* humano, el análisis de una secuencia de 1Kb que contiene la región 5' y el primer exón del gen demuestra que su región promotora no contiene cajas TATA o CAAT convencionales. Las predicciones *in silico* realizadas para localizar sitios putativos de unión de factores de transcripción en el extremo 5' del gen *P2RX4* muestran la presencia de un sitio GATA-2 en la posición -29/-20 muy próximo al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Los factores de transcripción GATA son una familia de proteínas caracterizadas, como su propio nombre indica, por su capacidad de unirse a la secuencia de ADN "GATA". Particularmente, GATA-2 se expresa principalmente en progenitores hematopoyéticos y en células madre embrionarias no hematopoyéticas donde promueve la proliferación celular (Tsai et al., 1994). Ensayos de actividad luciferasa han concluido que el fragmento de ADN localizado 62 pb antes del TSS presenta una elevada actividad transcripcional y que la delección del sitio GATA-2 reduce significativamente la actividad del promotor *P2RX4*. Además, mediante ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) en extractos nucleares de células sanguíneas mononucleares humanas combinados con el empleo de anticuerpos específicos se ha podido concluir que el factor de transcripción GATA-2 se une de manera específica a la región promotora proximal del gen *P2RX4* y que es uno de los factores de transcripción que regulan su expresión (Gu et al., 2010).

Curiosamente, se ha detectado un SNP en la región promotora proximal del gen *P2RX4* humano (-26 G>T) que reduce significativamente su expresión.

Estudios posteriores en células HUVEC han demostrado que en el extremo 5' del gen *P2RX4* existe un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 en la posición -67 a -58 respecto al TSS. Los ensayos de actividad luciferasa combinados con estudios funcionales indicaron que la sustitución de dos nucleótidos en el sitio de unión de Sp1 reduce significativamente la actividad del promotor *P2RX4*. Los ensayos de EMSA corroboran que el factor Sp1 está implicado en la regulación del gen *P2RX4*, ya que una disminución en la cantidad de Sp1 produce una disminución en la expresión del receptor P2X4 (Korenaga et al., 2001). Curiosamente, una depleción de vitamina A regula negativa y reversiblemente la expresión del receptor P2X4 humano. Este efecto puede ser revertido parcialmente por retinoides selectivos para receptores RARs, aunque no se ha observado efecto de los retinoides en roedores (Gorodeski, 2002).

2.3.4. Receptor P2X7.

Los estudios preliminares realizados por Buell y col. (1998) indican que la región de 2 kb en el extremo 5' del gen *P2RX7* humano presenta actividad promotora (Buell et al., 1998). Posteriormente, se ha localizado una zona promotora activa en la región -158/+32, aunque hasta la fecha no se han podido identificar los factores de transcripción que participan en dicha actividad promotora (Zhou et al., 2009). Mediante ensayos de actividad luciferasa combinados con EMSA se ha concluido que existen dos regiones *enhancer* situadas en las posiciones +222/+232 y +401/+573 muy lejos del promotor activo, detectándose al menos 3 regiones en las posiciones +217/+237, +401/+530 y +401/573 que presentaban complejos de ADN-proteína. Un análisis de secuencia muestra que la región +26/+576 contiene un elevado porcentaje en islas CpG muy próximas a los *enhancers*, por lo que se evidencia que la expresión del receptor P2X7 humano puede encontrarse regulada por la hipermetilación de las islas CpG que flanquean los *enhancers* situados muy por debajo del promotor activo. De hecho se han identificado 9 sitios CpG que funcionan como elementos en *cis* inhibidores y tres sitios que se encuentran hipermetilados en epitelio cervical *in vitro* e *in vivo*. Además, en células tumorales de cuello de útero el grado de hipermetilación de los sitios CpG es significativamente más elevado que el hallado en células normales (Zhou et al., 2009).

3. FAMILIA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SP1.

3.1. Introducción general.

La proteína de especificidad Sp1 fue identificada en los años 80, siendo uno de los primeros factores de transcripción purificado, clonado y caracterizado en células de mamífero (Dylan and Tjian, 1983; Kadonaga et al., 1987). Los primeros estudios demostraron que Sp1 reconoce y se une específicamente a regiones ricas en GC en el promotor del virus SV40 a través de tres dedos de zinc con motivos Cys₂His₂. En muchas proteínas reguladoras del desarrollo se encontró un dominio de unión a ADN muy similar al de Sp1, incluyendo el regulador embrionario Krüppel en *Drosophila* (Kadonaga et al., 1987). Posteriormente, se identificaron otros factores de transcripción que contenían motivos de dedos de zinc muy similares a los encontrados en Sp1 constituyendo así la familia de factores de transcripción Sp1/Krüppel “*like factor*” (KLF). Los miembros de esta familia se caracterizan, por tener un dominio de unión a ADN localizado en el extremo C-terminal altamente conservado (Kaczynski et al., 2003). Filogenéticamente, dentro de la familia Sp1/Krüppel, se han definido varios grupos basados en las similitudes de secuencia y función. Los factores que están más relacionados con Sp1 se nombran Sp1-Sp9 y forman el subgrupo I o proteínas “Sp”. Las otras proteínas tipo Sp1/KLF conforman los subgrupos II y III que se numeran como factores “KLF”, en orden de descubrimiento (Figura 7) (Kaczynski et al., 2003; Schaeper et al., 2010).

La proteína Sp1 pertenece a una familia de factores de transcripción que contiene más de 20 miembros identificados en mamíferos (Black et al., 2001). Se ha descrito que reconoce y se une a secuencias ricas en GC, incluyendo cajas GC, cajas CACCC (también llamadas cajas GT) y elementos de transcripción básicos. Estudios iniciales indicaron que Sp1 era responsable tanto de reclutar las proteínas de unión a las cajas TATA como de fijar el sitio de inicio de la transcripción en los promotores que carecían de caja TATA (Black et al., 2001). Estos hallazgos, junto con el hecho de que los sitios SP1 se encuentran en el promotor de muchos genes constitutivos o “*housekeeping*”, llevaron a la idea de que Sp1 actuaba como un factor de transcripción basal y que los sitios SP1 eran elementos constitutivos encargados de mantener la transcripción basal en estos promotores (Black et al., 2001). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que Sp1 se encuentra sometido a una amplia variedad de modificaciones postranscripcionales como glicosilaciones y fosforilaciones que indican claramente que su actividad transcripcional sí parece encontrarse estrechamente regulada (Kaczynski

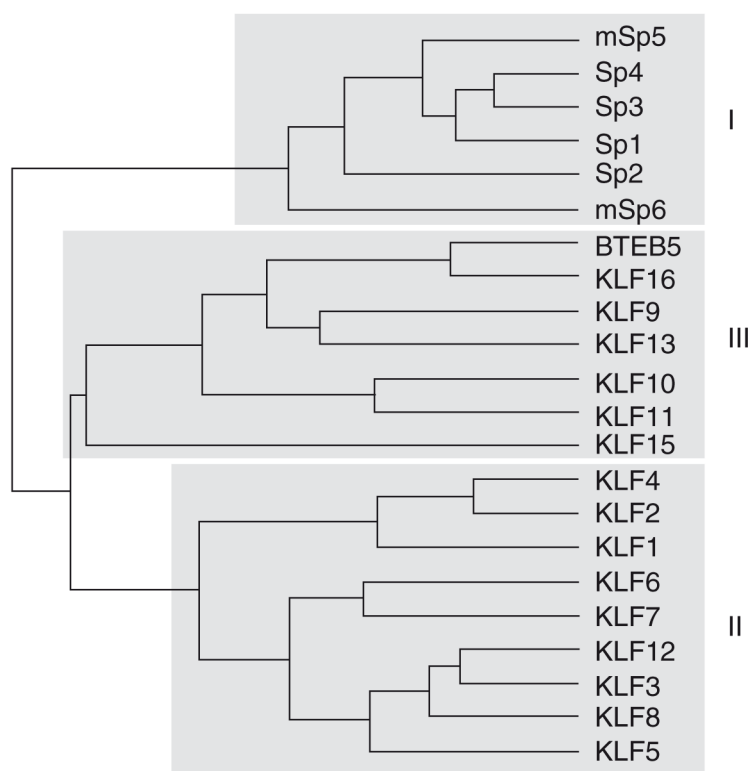


Figura 7. Árbol filogenético de las proteínas tipo Sp1 de humano y Sp5 y Sp6 de ratón. El árbol muestra las proteínas más representativas de cada grupo y fue generado utilizando el programa Genetic Computer Group (GCG) de análisis de secuencias. El subgrupo I contiene las proteínas más relacionadas con Sp1 (Sp1-Sp6).

et al., 2003). La identificación de muchos otros factores de transcripción con una elevada homología a Sp1, unido al hecho de que Sp1 es parte de una gran familia de multigenes, hace pensar que la transcripción mediada por estos factores es más compleja de lo que se había pensado en un primer momento (Black et al., 2001). A la diversidad de miembros pertenecientes a esta familia hay que añadir la existencia de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, como el procesamiento alternativo, la selección de promotores alternativos o la selección del codón de inicio, que generan una variedad muy grande de proteínas funcionales de la familia Sp1. Como podría esperarse dentro de esta gran diversidad, los miembros de esta familia también difieren en su actividad transcripcional, siendo algunos activadores, otros represores y otros con una función dual dependiendo de la línea celular o el promotor estudiado (Black et al., 2001).

El estudio de los promotores de algunos miembros de la familia Sp1/KLF ha revelado que, curiosamente, todos contienen sitios Sp1, indicando que pueden autorregularse y regular la expresión de otros miembros de la familia (Black et al., 2001; Nicolas et al., 2001). Respecto a su localización celular, algunos miembros de

la familia se expresan de manera ubicua, mientras que otros tienen una localización muy restringida a un único tejido. Toda esta información, unida al hecho de que los factores de esta familia pueden regularse a múltiples niveles (expresión, interacción con el promotor, interacción proteína-proteína...) parece indicar que la familia Sp1/KLF probablemente constituye una red a través de la cual la transcripción puede ser finamente regulada por cambios en los perfiles de expresión de sus miembros (Black et al., 2001).

Muchos de estos factores Sp1/KLF están implicados en la regulación del crecimiento y el control de las vías morfogénicas (Black et al., 1999; Marin et al., 1997). A diferencia de otros factores reguladores del desarrollo, cuyos genes se encuentran agrupados, los genes que codifican para las proteínas de la familia Sp1 se encuentran distribuidos aleatoriamente a lo largo del genoma. La localización de los genes *SP1-4* está estrechamente relacionada con la de genes que codifican para otros factores Sp (*SP5-9*), normalmente agrupados por pares. Los genes humanos que codifican para factores Sp están asociados a las agrupaciones de genes Hox (genes pertenecientes a la familia homeobox y muy implicados en el desarrollo embrionario) (Figura 8). Esto también se cumple en el ratón con excepción de la pareja de genes *SP4/SP8* que han perdido su asociación al grupo de HoxA (Suske et al., 2005).

Cromosoma humano

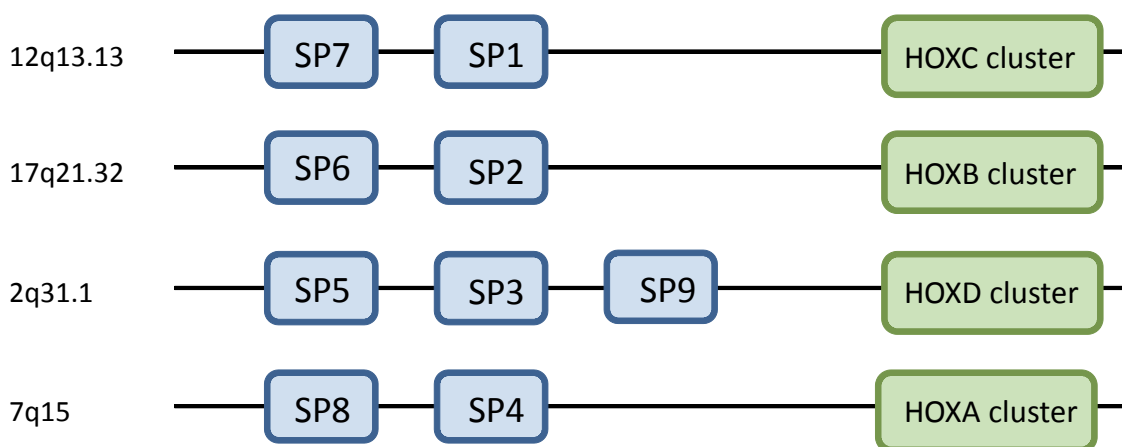


Figura 8. Localización cromosómica de los genes SP en humano. Los genes humanos que codifican para los factores de transcripción Sp están estrechamente relacionados con los cluster de los genes HOX.

3.2. Características estructurales.

Para llevar a cabo su función como factores de transcripción específicos, estas proteínas requieren de, al menos, un dominio de unión al ADN, un dominio que funcione como señal de localización intracelular y un dominio de regulación de la transcripción. El rasgo característico de las proteínas de la familia Sp1/KLF es un dominio de unión al ADN altamente conservado (con una homología de secuencia superior al 65%) localizado en el extremo C-terminal consistente en un tándem de tres dedos de zinc (Figura 9). Además de permitir la interacción con el ADN, los dedos de zinc pueden participar en las interacciones proteína-proteína que modulan la especificidad de unión al ADN. De hecho, las secuencias de localización nuclear (NLS) pueden localizarse adyacentes o dentro de los propios dedos de zinc (Kaczynski et al., 2003). La conservación de los dominios de unión al ADN entre diferentes miembros de esta familia implica que puedan interaccionar con las mismas secuencias de ADN. Así, en principio todos los miembros de la familia serían potencialmente capaces para unirse a los sitios SP1 en aquellas células en las que se expresen. Sin embargo es importante mencionar que los diferentes miembros tienen preferencia por diferentes secuencias. Por ejemplo Sp1, Sp3 y Sp4 se unen con mayor afinidad a cajas GC que a cajas CACCC mientras que muchos de los KLFs se unen preferentemente a cajas CACCC antes que a cajas GC (Black et al., 2001).

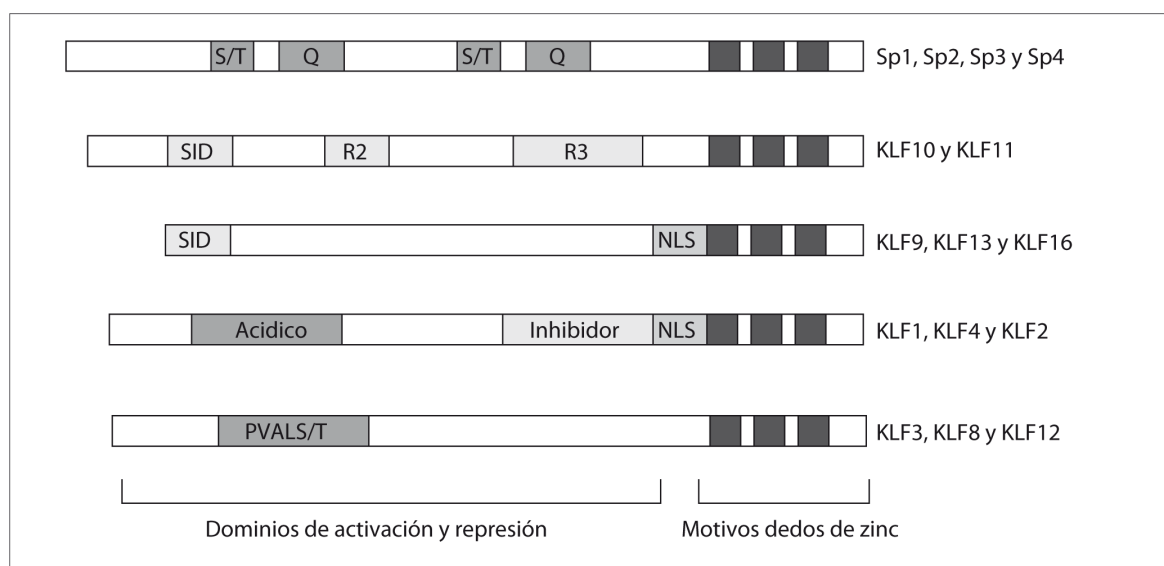


Figura 9. Características estructurales de las proteínas Sp1/KLF. Las proteínas de esta familia tienen un C-terminal altamente conservado formado por tres dedos de zinc encargados de reconocer la secuencia GC del ADN, mientras que el N-terminal es más variable (Kaczynski et al., 2003). Algunos miembros del subgrupo I (Sp1-4) contienen dominio ricos en Ser/Thr (S/T) y en Gln (Q). Otros dominios presentes en estas proteínas son la señal de localización nuclear (NLS) y el dominio de interacción con Sin3 (SID).

Respecto a la región N-terminal de las proteínas de la familia Sp1/KLF, es mucho más variable y contiene dominios de regulación de la transcripción. A pesar del alto grado de similitud en la actividad de los dominios de unión al ADN de las proteínas Sp1/KLF, los diferentes miembros de la familia pueden variar ampliamente en su habilidad para regular la transcripción, y por lo tanto para regular los procesos morfogénicos. Sp1, por ejemplo, es uno de los más potentes activadores transcripcionales descritos hasta la fecha (Suske, 1999), mientras que KLF11 funciona como un potente represor de la transcripción. Además muchos otros miembros de la familia pueden actuar como activadores o represores en función del contexto celular y del promotor al que se unan (Kaczynski et al., 2003). Estudios recientes han revelado que varios miembros de la familia Sp1/KLF regulan la transcripción interaccionando con co-activadores o co-represores a través de estos dominios específicos de regulación.

Centrándonos en las proteínas del tipo Sp, en mamíferos se han identificado 9 factores diferentes denominados de Sp1 a Sp9. En base a su homología de secuencia y a sus características estructurales se pueden dividir en tres subgrupos en función de su región N-terminal (Figura 9). El primer grupo está constituido por Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4, y son proteínas, en general más grandes, que contienen dominios ricos en glutamina, uno en el caso de Sp2 y dos en el caso de Sp1, Sp3 y Sp4, separados por una zona enriquecida mayoritariamente en residuos de serina y treonina (Schaeper et al., 2010). Sp1, Sp2 y Sp3 se expresan de manera ubicua mientras que Sp4 está restringido a células de origen neuronal (Terrados et al., 2012). La región de 81 aa que contiene los dedos de zinc, representa el dominio de unión al ADN y es la región más conservada en este subgrupo. El alineamiento de esta región muestra que Sp1, Sp3 y Sp4 están más relacionadas entre sí que con Sp2 (Figura 10A y B). De acuerdo con los estudios estructurales sobre la unión de dedos de zinc al ADN, se puede predecir que los residuos KHA en el primer dedo, RER en el segundo y RHK en el tercero contactan unas bases concretas del ADN. Estos aminoácidos críticos están conservados en Sp1, Sp3 y Sp4, pero no en Sp2. Consecuentemente, Sp1, Sp3 y Sp4 reconocen el sitio clásico de unión de Sp1 con idéntica afinidad. En Sp2, la histidina del primer dedo de zinc es sustituida por un residuo de leucina, haciendo que Sp2 tenga preferencia por unirse a regiones GT (5'-GGTGTGGG-3') en lugar de a regiones GC (Kingsley and Winoto, 1992; Suske, 1999). La estructura de este primer grupo es claramente diferente de las proteínas de los otros dos grupos Sp5/Btd y Sp6-9 que están constituidos por moléculas generalmente más pequeñas que contienen en la zona N-terminal una única región enriquecida en serina y/o prolina (Schaeper et al., 2010).

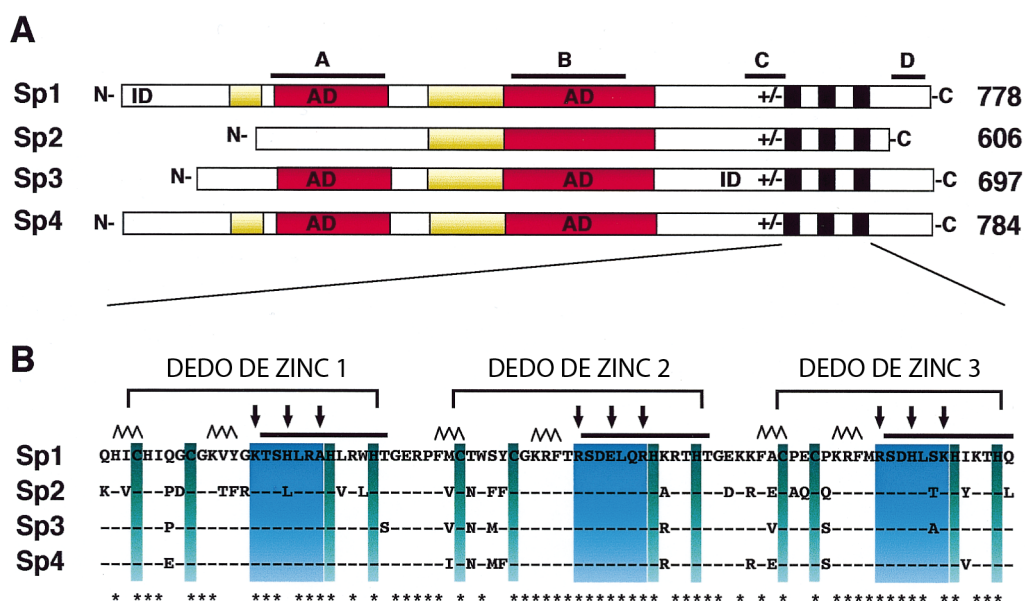


Figura 10. Características estructurales de las proteínas Sp. (A) Representación esquemática de los cuatro miembros mejor descritos de la familia de Sp en humano Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4. Las cajas coloreadas indican zonas ricas en residuos de glutamina (rojo) y serina/treonina (amarillo). La región que precede al primer dedo de zinc es rica en aminoácidos cargados. Las cajas negras representan los dedos de zinc. Los dominios de activación (AD) e inhibición (ID) conocidos están indicados. (B) Alineamiento de las secuencias correspondientes a los dedos de zinc. Los asteriscos de la parte inferior indican la identidad de secuencia. Los residuos de histidina y cisteína que se combinan con los iones de zinc están señalados en verde y las regiones de la proteína que contactan con el ADN están señaladas en azul. Las flechas señalan los aminoácidos encargados del reconocimiento específico de secuencia. Las líneas y el zigzag representan α -hélice y lámina β respectivamente.

3.3. Localización subcelular de las proteínas Sp.

Aquellas proteínas que ejercen su función en el núcleo, como los factores de transcripción, son translocadas a éste después de haber sido sintetizadas en el citosol. La translocación se lleva a cabo mediante una estructura denominada complejo de poro nuclear (NPC). Las proteínas pequeñas menores de 20 kDa pueden difundir libremente a través del NPC, sin embargo las proteínas mayores de 40-60 kDa poseen en su secuencia NLS que las dirigen al núcleo. Curiosamente, aunque el factor de transcripción Sp1 es una proteína de gran tamaño (105 kDa), en su secuencia aminoacídica no se ha encontrado una secuencia NLS y se conoce muy poco sobre su mecanismo de transporte. Estudios iniciales describieron que la región C-terminal era necesaria para translocar el factor de transcripción al núcleo (Kuwahara et al., 1999). Estudios posteriores describen con más detalle la región implicada demostrando que los tres dedos de zinc que funcionan como dominio de unión al ADN también funcionan como NLS, y la correcta conformación del primero y el tercero son fundamentales para la localización nuclear de Sp1. Estos dedos de zinc se unen al factor de transporte y Sp1 puede pasar a través del NPC. Estudios en profundidad muestran la interacción de

Sp1 con el factor de transporte importina α y no con la importina β y sugieren que el transporte de Sp1 hasta el núcleo ocurre a través de un mecanismo típico mediado por las importinas α y β que requiere ATP (Ito et al., 2010).

3.4. Propiedades funcionales de las proteínas Sp.

A pesar de las similitudes estructurales y de sus patrones de expresión parece que la redundancia funcional entre los miembros de esta familia es escasa, ya que los genes diana para cada uno de estos factores Sp parecen diferentes como demuestran las siguientes evidencias: el ratón deficiente en Sp1 (Sp1 KO) muere alrededor del día embrionario 10 (E10), el ratón Sp2 KO muestra un severo retraso en el crecimiento con una amplia variedad de anormalidades fenotípicas y muere antes del día E9.5, el ratón Sp3 KO se desarrolla hasta el final de la gestación y muere inmediatamente después del nacimiento debido a varios defectos en el desarrollo pulmonar y cardíaco, defectos en la osificación de los huesos, en el desarrollo dental y en la organización de la placenta. Además, de acuerdo con la expresión localizada de Sp4, el ratón Sp4 KO es viable pero dos tercios mueren en el primer mes de vida postnatal por problemas relacionados con el sistema circulatorio cardíaco y el desarrollo normal del cerebro (Terrados et al., 2012).

3.4.1. El factor Sp1.

Como se ha mencionado previamente la proteína Sp1 fue uno de los primeros factores de transcripción identificados y clonados en eucariotas como proteína de unión al promotor de SV40 (Dylan and Tjian, 1983; Kadonaga et al., 1987). Sp1 es una proteína nuclear abundante en la mayoría de las células eucariotas, aunque su nivel de expresión varía durante el desarrollo y en función del tipo celular. Dado que los sitios SP1 colocalizan con frecuencia con islas CpG, se sugiere que la unión de Sp1 puede prevenir la metilación de dichas islas CpG dentro del ADN, fenómeno de vital importancia para el mantenimiento de un patrón apropiado de metilación en el genoma que permita el correcto desarrollo del individuo. Además Sp1 desempeña un papel importante en el mantenimiento de la arquitectura nuclear puesto que puede estar implicado en la remodelación de la estructura de la cromatina. Por último, como se detallará más adelante, Sp1 es capaz de regular la expresión de genes vinculados al ciclo celular como la timidina quinasa o la dihidrofolato reductasa (Marin et al., 1997).

A lo largo de la secuencia de Sp1 se encuentran varias regiones con diferentes funciones. En la región central de la proteína existen dos regiones ricas en glutamina

que pueden funcionar como dominios fuertes de activación, mientras que en la región N-terminal se ha descrito un dominio inhibidor (Figura 10A). Además, Sp1 es capaz de mediar una acción sinérgica en los promotores que contienen múltiples cajas GC que se lleva a cabo gracias a la función de una pequeña región situada en el extremo del dominio C-terminal (Suske, 1999).

3.4.2. El factor Sp2.

Sp2 es un miembro de la familia Sp1 poco caracterizado, aunque se ha demostrado que lo expresan un variado número de tipos celulares de origen humano (Moorefield et al., 2004). La presencia de un dominio rico en glutamina sugiere que posee un putativo dominio de activación (Figura 9 y 10A) (Suske, 1999). Los últimos hallazgos proponen para Sp2 un papel en el control de procesos celulares implicados en proliferación así como en procesos de diferenciación celular. La expresión ectópica de Sp2 en queratinocitos evita la diferenciación y promueve la tumorigénesis inducida por carcinógenos en ratones transgénicos (Terrados et al., 2012). A pesar de estar bien establecido su significado fisiológico, sus propiedades bioquímicas y moleculares se desconocen. Utilizando técnicas de PCR se ha identificado que la secuencia de consenso reconocida por Sp2 (5'-GGGCGGGAC-3') es muy similar a la de otros miembros de la familia Sp1, sin embargo, no se ha detectado unión de Sp2 al ADN en extractos nucleares de células que expresan Sp2. Es más, ensayos con vectores reporteros de Sp2 han demostrado muy poca o ninguna capacidad para activar promotores que son inducidos eficazmente por otros miembros de la familia (Moorefield et al., 2004). Por otra parte, ya que Sp2 se localiza asociado a la matriz nuclear y predominantemente en los focos subnucleares, se ha propuesto que Sp2 puede desempeñar funciones que no estén directamente relacionadas con la regulación de la expresión génica (Terrados et al., 2012).

3.4.3. El factor Sp3: activador vs represor.

Los primeros estudios sobre las propiedades transcripcionales de Sp3 resultaron altamente contradictorios. Así, algunos trabajos demostraban que Sp3 era un activador transcripcional de manera similar a Sp1, mientras que otros estudios indicaban que apenas tenía actividad transcripcional o ésta era muy débil. Además, se observaba que cuando se expresaba al mismo nivel que Sp1, Sp3 competía por el sitio de unión ADN disminuyendo la actividad de Sp1 y, en consecuencia, reprimiendo la transcripción génica (Suske, 1999). Actualmente se sabe que existen tres isoformas de Sp3, una de 110-115 kDa y otras dos de 60-70 kDa, de forma que tanto la estructura como el

reconocimiento de los sitios de unión en el ADN y el propio contexto celular pueden determinar si Sp3 es transcripcionalmente inactivo (pudiendo interferir la activación mediada por Sp1) o si, por el contrario, funciona como un activador fuerte similar a Sp1. La base molecular para la inactividad de Sp3 en determinadas circunstancias se ha localizado en un dominio inhibitorio situado entre el segundo motivo rico en glutamina y el primer dedo de zinc (Figura 10A). El triplete de aminoácidos KEE localizado en esta región es imprescindible para su función represora, ya que la mutación de estos residuos convierte un Sp3 inactivo en un potente activador (Suske, 1999).

Está claro que en un determinado tipo celular en el que conviva la expresión entre Sp1 y Sp3, estas dos proteínas compiten por unirse a los mismos sitios en el ADN. Los datos de los que se dispone hasta la fecha indican que se ambos factores se diferencian en su capacidad para activar o inhibir la transcripción. Independientemente de si Sp3 actúa como activador o como represor de la actividad mediada por Sp1, la cantidad relativa de ambas proteínas posibilita una regulación transcripcional diferencial dependiendo de los tipos celulares. Así, en células endoteliales que contienen elevados niveles ambas proteínas la proporción Sp1/Sp3 es más alta que en células no endoteliales. Además se ha descrito que determinadas condiciones fisiológicas o patológicas pueden alterar el ratio Sp1/Sp3. Por ejemplo, en queratinocitos el nivel de Sp3 excede al de Sp1. Sin embargo este cociente se invierte cuando las células se diferencian *in vitro* por tratamiento con altas concentraciones de calcio, sugiriendo que la transcripción diferencial entre distintos tipos celulares puede estar regulada por la relación Sp1/Sp3. En miocitos la hipoxia causa una depleción progresiva de Sp3, mientras que la cantidad de Sp1 permanece inalterada (Suske, 1999).

3.4.4. El factor Sp4: el específico de tejido.

Al contrario de la distribución ubicua descrita para Sp1 y Sp3, la expresión de Sp4 parece estar limitada a determinados tejidos, fundamentalmente en el SNC donde el déficit de Sp4 provoca alteraciones en el comportamiento (Suske, 1999). Además Sp4 muestra propiedades funcionales específicas diferentes de Sp1 y Sp3. La función de transactivación reside, como en Sp1, en el dominio N-terminal. Sin embargo, a diferencia de Sp1, Sp4 no es capaz de actuar sinérgicamente a través de sitios de unión adyacentes, aunque puede funcionar como diana para los dominios de activación de Sp1 en ensayos de superactivación indicando que sus dominios de activación se encuentran funcionalmente relacionados (Suske, 1999).

3.5. Mecanismos de regulación postranscripcional de Sp1.

Como se ha mencionado previamente, las primeras evidencias encontradas parecían indicar que los sitios SP1 eran elementos encargados de mantener la transcripción basal de los genes constitutivos (Black et al., 2001). Sin embargo, estudios posteriores demuestran que Sp1 se encuentra sometido a una amplia variedad de modificaciones postransduccionales como fosforilaciones, defosforilaciones, glicosilaciones, acetilaciones, sumoilaciones y ubiquitinaciones, que pueden regular la estabilidad y la actividad transcripcional de Sp1 (Kaczynski et al., 2003). De todas estas modificaciones, las mejor y más extensamente descritas se refieren al estado de fosforilación y glicosilación de Sp1.

3.5.1. Fosforilación de Sp1.

El estado de fosforilación de Sp1 influye en su actividad transcripcional pudiendo afectar tanto positiva como negativamente la unión del factor al ADN. La proteína Sp1 humana presenta 61 sitios putativos de fosforilación a lo largo de su secuencia, aunque la influencia de todas estas fosforilaciones en su función todavía no se conoce en profundidad. Dentro de las proteína quinasas que fosforilan y regulan la actividad de Sp1 destacan las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), la vía PI3K/Akt, PKC- ζ , MAPK y la quinasa caseína II (CKII) (Tan and Khachigian, 2009).

- a) Sp1 es fosforilado por la CDK en la serina 59 (correspondiente a la Ser61 en ratón). Además la ciclina A forma un complejo con CDK capaz de fosforilar Sp1 en el dominio N-terminal incrementando su interacción con determinados promotores, como el de la dihidrofolato reductasa (Fojas de Borja et al., 2001).
- b) Varios estudios implican a la vía de señalización PI3K/Akt en la actividad mediada por Sp1 (Bae et al., 2006; Chen et al., 2009), sugiriendo que Akt puede fosforilar directamente Sp1 (Pore et al., 2004).
- c) Estudios iniciales llevados a cabo por Pal y col. (Pal et al., 1998) demostraron que la PKC ζ puede unirse a la región de dedos de zinc de Sp1 y fosforilarlo. Actualmente se sabe que los residuos Thr668, Ser670 y Thr681 de Sp1 son dianas de fosforilación para la PKC ζ (Tan et al., 2008). Estudios con dominantes negativos de PKC ζ han demostrado que esta quinasa media señales de apoptosis mediante la fosforilación de Sp1 y la consiguiente regulación de la expresión del gen *FasL* (Kavurma et al., 2001). También se ha descrito que la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF está regulado por Sp1 vía PKC ζ (Rafty and Khachigian, 2001).

Además, un análisis mutacional ha revelado que la fosforilación de Sp1 en la Ser641 por PKC ζ ejerce un papel crítico en la activación del gen del receptor de hormona luteinizante inducida por tricostatina A, un inhibidor de las histona desacetilasas (Zhang et al., 2006). Estudios posteriores utilizando inhibidores de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) como la wortmanina o el LY29004 han demostrado que la PI3K es imprescindible para la fosforilación de Sp1 mediada por PKC ζ , puesto que PI3K puede regular la actividad de PKC ζ (Zhang et al., 2008).

- d) La MAPK aumenta la actividad transcripcional de Sp1 fosforilándola en dos residuos de treonina Thr453 y Thr739. Cuando estos residuos se mutan por alanina, la actividad transcripcional de Sp1 en el promotor del factor de crecimiento de endotelio vascular se reduce al 50% (Milanini-Mongiat et al., 2002). También se ha descrito que la fosforilación de Sp1 en Thr355 activa el promotor del gen la apolipoproteína A1 en células HepG2 expuestas al factor de crecimiento epidérmico e insulina vía MAPK/ERK (Zheng et al., 2001). La quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) también fosforila Sp1 en dos residuos de treonina Thr278 y Thr739 protegiéndolo de la degradación dependiente de ubiquitina y aumentando su estabilidad durante la mitosis en líneas tumorales (Chuang et al., 2008).
- e) Estudios llevados a cabo en células de hígado de rata han mostrado que la fosforilación de Sp1 durante la diferenciación terminal del animal completo resulta en una disminución de la unión de Sp1 al ADN (Leggett et al., 1995). La responsable de esta fosforilación es la CKII que fosforila la Thr579 impidiendo la unión del factor al ADN. La mutación de la Thr579 elimina la fosforilación en el sitio consenso de CKII evitando la inhibición mediada por esta quinasa (Armstrong et al., 1997).

3.5.2. Defosforilación de Sp1.

El papel de las fosfatasas en el mantenimiento de la fosforilación de Sp1 es tan importante como el de las quinasas. Las proteínas fosfatasas 1 y 2A (PP1 y PP2A) son las principales fosfatasas de residuos de serina y treonina en células eucariotas y su papel en la regulación de Sp1 ha sido firmemente demostrado. Numerosos grupos de investigación han puesto en evidencia que el ácido okadaico, un inhibidor de PP1 y PP2A, incrementa el nivel de fosforilación de Sp1, sugiriendo que la fosforilación de Sp1 en condiciones basales se encuentra suprimida por acción de las fosfatasas. No está claro si *in vivo* las fosfatasas defosforilan directamente Sp1, aunque sí se ha confirmado que lo hacen *in vitro*, por lo que se hipotetiza que el estado de fosforilación de Sp1 es un equilibrio entre las quinasas y las fosfatasas celulares (Chu and Ferro, 2005).

La defosforilación de Sp1 por PP2A está relacionada con fenómenos de proliferación celular. Este evento ocurre en la interfase del ciclo celular, aumentando la actividad transcripcional de Sp1 y su afinidad por el ADN *in vitro*. La combinación de mutaciones puntuales en la secuencia de Sp1 junto con anticuerpos fosfo-específicos ha permitido identificar la serina 59 como la diana principal de PP2A durante la interfase del ciclo celular. La defosforilación de la Ser 59 parece regular positivamente la asociación de Sp1 a la cromatina mediante la regulación de la glicosilación de Sp1 en el dominio C-terminal que media su interacción con el ADN (Vicart et al., 2006). También se ha demostrado que la Thr 681, que pertenece a la región N-terminal de Sp1, es otra diana de la PP2A. Se ha propuesto que la defosforilación coordinada de varios residuos de Sp1, una característica común de las células en división, es un mecanismo post-transcripcional imprescindible para la transcripción dependiente de Sp1 de genes relacionados con la división celular (Vicart et al., 2006).

3.5.3. Glicosilación.

La *O*-glicosilación consiste en la adición covalente de una *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) mediante un enlace *O*-glucosídico y se trata de modificación postraducciona que se produce frecuentemente en proteínas tanto nucleares como citosólicas (Hart, 1997). La glicosilación de Sp1 por acción del enzima *O*-GlcNAc transferasa (OGT) (O'Donnell et al., 2004) está asociada a múltiples cambios en su función incluyendo la alteración de su interacción con otros factores de transcripción o consigo mismo (Roos et al., 1997) y la modulación de su degradación (Han and Kudlow, 1997). Un aumento en la glicosilación de Sp1 causado por el tratamiento con un inhibidor de la acetilglucosaminidasa conlleva una disminución de la fosforilación sugiriendo que la glicosilación y la fosforilación de Sp1 son procesos coordinados (Haltiwanger et al., 1998). Existe cierta controversia respecto al efecto que ejerce la glicosilación de Sp1 en su actividad transcripcional. Por una parte se ha caracterizado en diversos modelos celulares que existe una relación positiva entre la *O*-GlcNAcilación y la actividad transcripcional de Sp1 (Jackson and Tjian, 1988; Jackson and Tjian, 1989; Majumdar et al., 2006), demostrándose que la glicosilación de Sp1 disminuye en presencia de un dominante negativo de OGT, lo que conlleva una disminución en la expresión de genes regulados por Sp1 (Goldberg et al., 2006). También sea demostrado que la *O*-GlcNAcilación de Sp1 promueve su translocación a núcleo coincidiendo temporalmente con una tasa acelerada de transcripción del gen de la calmodulina, cuya expresión está regulada por Sp1. También se postula que la glicosilación y fosforilación de ciertos residuos clave de serina suceden de manera secuencial pero

excluyente provocando la migración de Sp1 al núcleo, incrementando así su potencial transactivador (Figura 11) (Solomon et al., 2008). Por el contrario, otros estudios han descrito que la glicosilación de Sp1 se asocia con a una represión transcripcional en células pancreáticas, células HeLa y hepatomas (Yang et al., 2001; Yang et al., 2002). La modificación de Sp1 por *O*-GlcNAc también puede estar implicada en la regulación de la estabilidad de Sp1. El tratamiento de las células con glucosa o glucosamina provoca una hiperglicosilación de Sp1 que bloquea su degradación sugiriendo que la modificación por *O*-GlcNAc de Sp1 aumenta su estabilidad (Han and Kudlow, 1997).

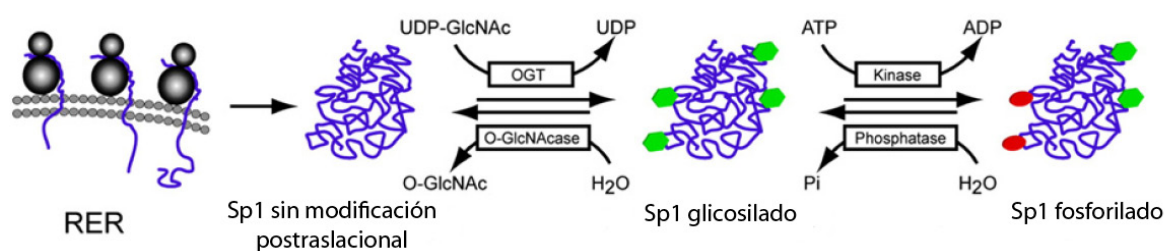


Figura 11. El enzima *O*-GlcNAc transferasa (OGT) modifica covalentemente Sp1 añadiendo *O*-GlcNAc que posteriormente son eliminados por la *O*-GlcNAcase. Ya que la glicosilación y la fosforilación se producen en los mismos residuos de serina y treonina estas modificaciones están recíprocamente reguladas (Solomon et al., 2008).

4. EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR).

4.1. Introducción general.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue descrito por primera vez en 1962 por Stanley Cohen, como una molécula capaz de acelerar la erupción dentaria y la apertura ocular en animales neonatos (Cohen, 1962). Posteriormente, el papel del EGF durante la embriogénesis se confirmó con la generación de ratones deficientes para el receptor de EGF que morían en el período neonatal debido a la inmadurez de determinados órganos (Wells, 1999). Ya en el animal adulto, el EGF está implicado en la regeneración tisular, que podría ser interpretada como una neo-organogénesis en la que participan procesos de proliferación celular, movilidad celular en el interior de tejidos sólidos y angiogénesis.

El receptor del EGF (EGFR) es el miembro más destacado de la familia de receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa denominada HER/ErbB que comprende 4 subtipos de receptores: EGFR o ErbB1, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 (Figura 12)

(Moghal and Sternberg, 1999). Fue el primer receptor al que se le asignó actividad tirosina quinasa cuando se descubrió que la unión del EGF a membranas *in vitro* provocaba un aumento de la fosforilación de varias glicoproteínas, principalmente de dos proteínas que coincidían en peso molecular con el descrito para el entonces putativo receptor de EGF (Cohen, 1983). Actualmente se conoce que el EGFR presenta una actividad tirosina quinasa dependiente de ligando que fosforila residuos de tirosina localizados en el propio receptor (autofosforilación) o en moléculas que quedan por debajo en su cascada de señalización y que se encargan de regular procesos de proliferación, migración, diferenciación y homeóstasis (Wells, 1999).

El EGFR es una glicoproteína transmembrana de 1186 aa codificada por un gen que consta de 26 exones identificado inicialmente como un protooncogén (Harris et al., 1992; Wells, 1999). Existen dos variantes de *splicing* del EGFR: la primera es una variante próxima al segmento transmembrana que genera una forma soluble de EGFR capaz de actuar como dominante negativo en condiciones experimentales. La segunda es una variante constitutivamente activa (EGFR vIII) que carece de los exones 2 al 7 y que está involucrada en el desarrollo de tumores (Figura 13) (Nishikawa et al., 1994). El dominio extracelular amino terminal consta de 622 aa y contiene dos dominios ricos en cisteína que constituyen el dominio de unión al ligando, la porción transmembrana está constituida por un único dominio α -hélice, y el dominio carboxilo terminal es intracelular y está formado por 542 aa ácidos que pueden ser agrupados

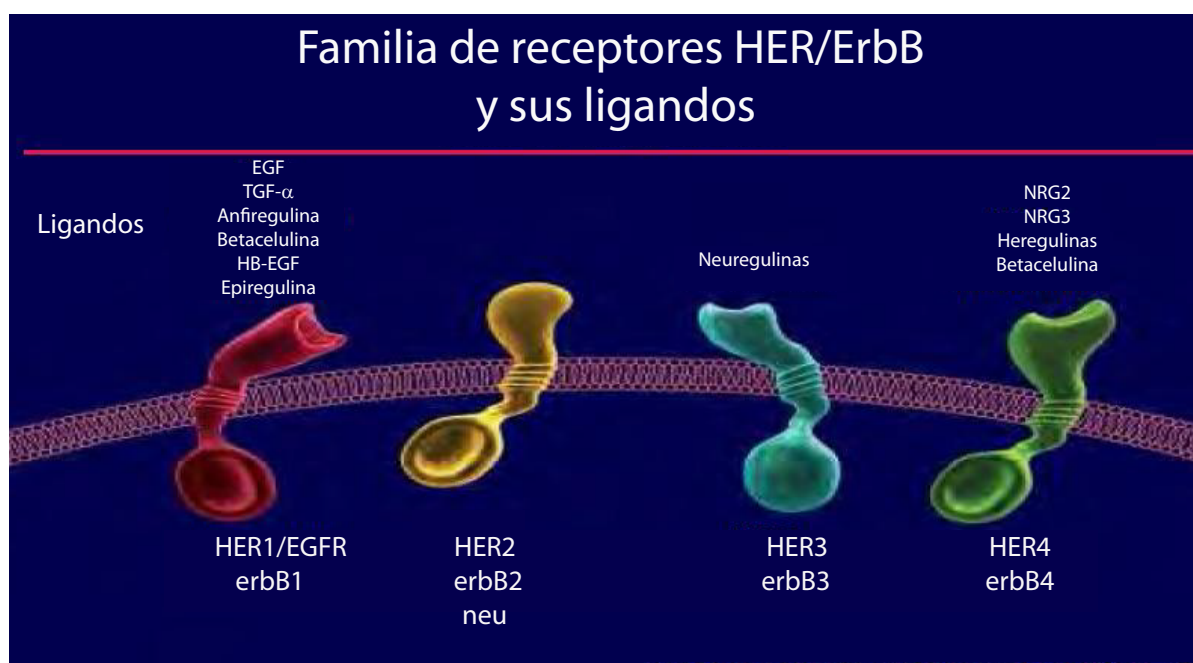


Figura 12. Receptores de la familia HER. Existen 4 subtipos denominados erbB1, erbB2, erbB3 y erbB4 (Salomon et al., 1995).

en tres dominios diferentes. El primero y más próximo a la membrana es el lugar donde se reciben las señales de retroalimentación negativa mediadas por PKC y ERK. A continuación le sigue un dominio tirosina quinasa de unos 250 aa y por último un extremo C-terminal de 229 aa que contiene cinco motivos de autofosforilación, tres motivos de internalización y diversos sitios de trans-fosforilación, activación proteolítica y degradación. Este dominio posee una función de autoinhibición, es decir, si no se elimina o en ausencia de autofosforilación, el EGFR activado es incapaz de fosforilar a sus sustratos (Wells, 1999).

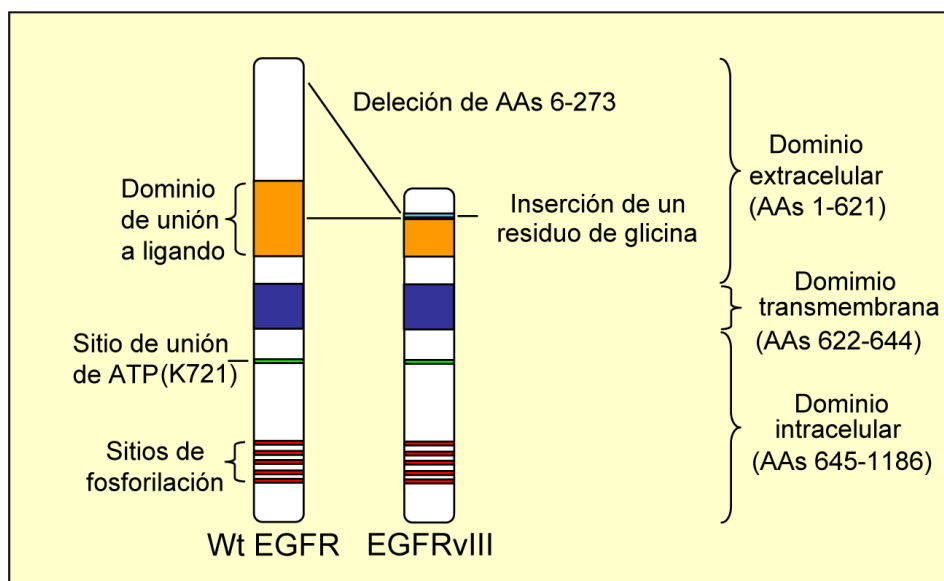


Figura 13. Representación esquemática del receptor de EGF y la versión truncada EGFR vIII. Esta variante se caracteriza por una delección los exones 2-7 de la versión wild type que genera una versión del EGFR constitutivamente activa que es incapaz de unir ligando (Gan et al., 2009).

El EGFR actúa como receptor de múltiples ligandos entre los que se incluyen el EGF, el factor de crecimiento transformante- α (TGF α), el EGF de unión a heparina (HB-EGF), la anfiregulina y numerosos factores virales. Muchos de los ligandos de este receptor son moléculas dimericas que contienen dos epítomos idénticos de unión al receptor. Otros ligandos, como es el caso del EGF, tienen aparentemente una configuración monomérica aunque existen estudios calorimétricos que demuestran que, curiosamente, una única molécula de EGF es capaz de unirse simultáneamente a dos moléculas de receptor (Lemmon and Schlessinger, 1994). Tras la unión del ligando al receptor y su consecuente activación, el EGFR se internaliza vía endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina (Vieira et al., 1996). El destino del EGFR depende del ligando que una: el EGF permanece unido al EGFR en el compartimento endosómico dirigiendo al receptor a su degradación, mientras que la activación por TGF α viene acompañada por una disociación del complejo ligando-receptor que es

sensible a pH y que favorece el reciclaje del EGFR. La internalización del EGFR inducida por ligando y su posterior degradación provoca una atenuación de la señal con una retirada neta del receptor de la membrana o con una disminución del propio ligando (Reddy et al., 1996). Así, diferentes ligandos pueden dictar la intensidad y duración de la señal transducida por el EGFR, lo que da un sentido fisiológico a la existencia de diversos ligandos.

4.2. Señalización intracelular acoplada al EGFR.

Como se ha mencionado previamente, el EGFR posee una actividad tirosina quinasa intrínseca que les permite autofosforilarse, desencadenando una cascada intracelular de señales moleculares que modulan la expresión de determinados genes e inducen respuestas celulares tan dispares como la apoptosis, la migración celular, la progresión del ciclo celular o la diferenciación celular incluso en el mismo tipo celular dependiendo del contexto en el que se encuentre (densidad celular, tipo de matriz extracelular, presencia de citoquinas, etc...). La señalización mediada por el EGFR ocurre mediante un proceso secuencial que se inicia tras la interacción entre el receptor y su ligando, hecho que induce la dimerización de dos moléculas del mismo receptor (homodimerización) o de diferentes receptores de la familia HER/ ErbB (heterodimerización) (Heldin, 1995). A la dimerización del receptor le sigue una autofosforilación cruzada del receptor en residuos de tirosina (Ullrich and Schlessinger, 1990). En el caso del EGFR, los residuos de tirosina que se fosforilan están situados fuera del dominio quinasa y permiten crear sitios de anclaje para moléculas que contienen dominios de homología Src 2 (SH2) implicadas en la transducción de señales. Los dominios SH2 están constituidos por 100 aa plegados de tal manera que forman un bolsillo en el que penetra la tirosina fosforilada y los residuos próximos (Pawson and Schlessingert, 1993). La activación del EGFR precipita a su vez la activación de numerosas cascadas de señalización intracelular incluyendo las vías de Ras/MAPK, PI3K, fosfolipasa D (PLD), PKC, etc. (Wells, 1999). Estas vías intracelulares desencadenan múltiples respuestas biológicas, por ejemplo, la señalización dependiente de Ras/MAP quinasa estimula la división y migración celular y juega un papel altamente significativo en los procesos de carcinogénesis (Katz and McCormick, 1997). A continuación se detallan algunas de las proteínas quinasas que participan en la transducción de señales intracelulares acopladas a la activación del EGFR.

4.2.1. Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).

La familia PI3K está formada por proteínas heterodiméricas constituidas por una subunidad reguladora de 85 kDa (p85) y una subunidad catalítica de 110 kDa (p110). Existen siete tipos distintos de p85 originados por *splicing* alternativo de tres genes (p85 α , p85 β y p55 γ) y tres isoformas conocidas de p110 (α , β y δ) (Fruman et al., 1998). La subunidad reguladora, también denominada subunidad adaptadora por ser la que establece una interacción directa con los residuos de tirosina fosforilados del EGFR activo, mantiene a la subunidad catalítica en un estado de baja actividad en las células quiescentes y media su activación cuando se requiere. Las subunidades p85 α y p85 β contienen un dominio de homología Src-3 (SH3), dos o tres segmentos ricos en prolina, un dominio rho-GAP capaz de activar las proteínas GTPasas y dos dominios SH2. Estos dominios SH2, como los SH2 presentes en otras proteínas señalizadoras, se unen selectivamente a residuos de tirosina fosforilados ubicados en una secuencia específica (Felder et al., 1993). Entre los dos dominios SH2 hay una región llamada dominio inter-SH2 formada por α -hélices plegadas en una estructura superenrollada que resulta necesaria para la interacción con el extremo N-terminal de la subunidad p110 (Figura 14).

La familia PI3K se divide en las subfamilias I, II y III en función de la especificidad de sustrato. El tipo I es ubicuo y el más estudiado en mamíferos, y se divide a su vez en los subtipos IA y IB. Mientras que la PI3K IB es activada exclusivamente por GPCRs, la PI3K IA se encuentra acoplada tanto a receptores tirosina quinasa como a GPCRs y es la principal responsable de fosforilar fosfatidilinosoles en la posición D-3 del anillo (Fruman et al., 1998). La PI3K puede fosforilar diversos fosfolípidos de membrana incluyendo el 4-fosfo-fosfatidilinositol y el 4,5-bifosfo-fosfatidilinositol formando así el 3,4-bifosfo-fosfatidilinositol (PIP2) y el 3,4,5-trifosfo-fosfatidilinositol (PIP3) que actúan como importantes segundos mensajeros. Así, tras la activación del EGFR, p85 se asocia con los residuos de tirosina fosforilados del receptor vía el dominio SH2 y, a continuación, p110 transfiere el grupo fosfato a los fosfolípidos mencionados

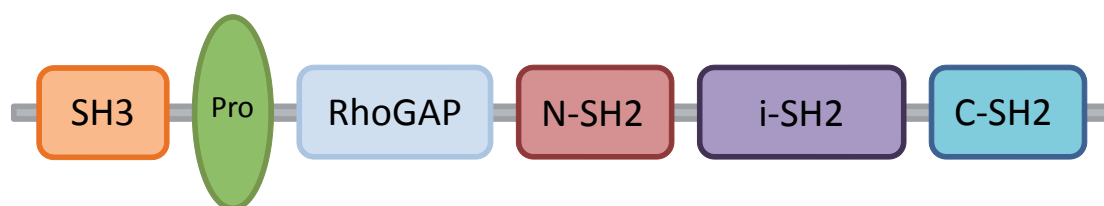


Figura 14. Representación esquemática de la subunidad reguladora p85. Para p85 hay un dominio SH3 dos o tres segmentos ricos en prolina, un dominio rho-GAP capaz de activar las proteínas GTPasas y dos dominios SH2 separados por una estructura superenrollada que resulta necesaria para la interacción con el extremo N-terminal de la subunidad p110.

anteriormente. La fosforilación de estos fosfolípidos de membrana, especialmente PIP3, pone en movimiento una serie de eventos coordinados encaminados a favorecer el crecimiento celular, la entrada en ciclo celular, la migración y la supervivencia. Para coordinar toda esta actividad celular existen diversas proteínas, incluyendo algunas serina/treonina quinasas, tirosina quinasas y factores de intercambio que regulan proteínas G, que poseen dominios de unión específicos para el PIP3. Aunque estas proteínas se localizan en el citosol, una vez activada la vía PI3K son reclutadas en la membrana celular dada su facilidad para asociarse con el PIP3 recién formado. Una vez próximas a la membrana estas proteínas se activan iniciando diversas respuestas locales tales como la polimerización de la actina, el ensamblaje de los complejos de señalización o la iniciación de las cascadas de proteínas quinasas citosólicas (Fruman et al., 1998), (revisión (Vanhaesebroeck et al., 2012)). Además de su actividad quinasa para lípidos, las PI3Ks tipo I poseen actividad proteína quinasa intrínseca, siendo su sustrato principal los residuos de serina de la misma subunidad catalítica y/o de la subunidad reguladora que lleve asociada. Por ejemplo, p100 α fosforila p85 α en la serina 608 provocando una disminución de la actividad lípido quinasa de p110 (Dhand et al., 1994; Stoyanova et al., 1997; Vanhaesebroeck et al., 1997, Carpenter, 1993 #2278). En cuanto a los inhibidores conocidos, la wortmanina es un potente inhibidor irreversible de las PI3Ks de tipo I y actúa inhibiendo la subunidad p110 α al reaccionar de forma covalente con la lisina 802 (Wymann et al., 1996). Otro inhibidor muy utilizado es el LY294002, un inhibidor reversible que requiere concentraciones mayores que la wortmanina (Vlahos et al., 1994).

Como se ha mencionado anteriormente, en las zonas de la membrana celular donde hay actividad de PI3K, se acumulan muchas proteínas de señalización con dominios de homología a plextrina (PH) mediante su unión directa con el PIP3 formado. De entre todas ellas hay dos que destacan por su especial interés: la quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK-1) y la proteína quinasa B (PKB), también denominada Akt. La asociación de PDK-1 y Akt con el PIP3 en la membrana aproxima ambas proteínas facilitando la fosforilación de Akt por PDK-1 (Lawlor and Alessi, 2001). Esta fosforilación estimula la actividad catalítica de Akt que, siendo la principal quinasa efectora de PI3K, fosforila una serie de proteínas involucradas en la regulación del crecimiento celular, ciclo celular y supervivencia. Además de fosforilar Akt, PDK-1 puede fosforilar otras proteínas quinasas implicadas en proliferación celular y supervivencia incluyendo la PKC ζ que también está involucrada en multitud de respuestas celulares (Figura 15) (Cantley, 2002).

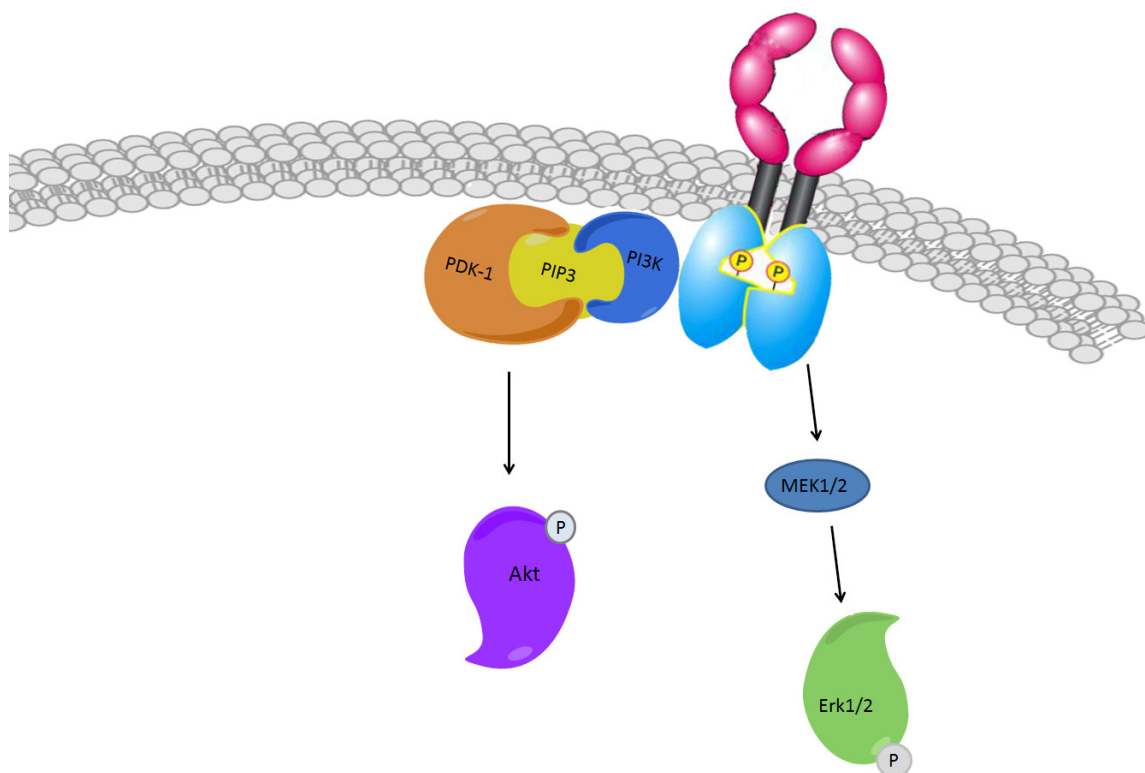


Figura 15. Esquema de la activación de la ruta de señalización del receptor de EGF en respuesta a factores de crecimiento. Se muestran las cascadas señalización de MEK1/2/Erk1/2 y PI3K/Akt por ser las vías efectoras canónicas acopladas al receptor de EGF.

Akt/PKB es una serina/treonina quinasa de 57 kDa capaz de fosforilar proteínas en la secuencia consenso RxRxxS/T (siendo R= arginina) y con propiedades similares a la PKC y PKA (denominadas en conjunto AGC quinasas). Existen tres isoformas de Akt, α , β y γ , pero todas conservan la misma estructura: un dominio amino terminal PH, un dominio quinasa central y un extremo C-terminal que contiene el motivo hidrofóbico (HM) característico de las AGC quinasas y que actúa como dominio regulador. Akt requiere para su activación la fosforilación de dos residuos: treonina 308 y serina 473 (Figura 16). Como se ha mencionado anteriormente, una de las proteínas responsables de esta activación es la PDK-1, siendo la responsable de la fosforilación en treonina 308. La serina 473 es fosforilada por la proteína de mamífero diana de rapamicina (mTOR). Una vez activada, Akt abandona el núcleo y se dirige al citosol para fosforilar sustratos intracelulares que a su vez regulan, directa o indirectamente, eventos celulares como la proliferación y la supervivencia (McCubrey et al.; Steelman et al.). Su actividad es controlada por numerosos mecanismos de regulación incluyendo los niveles de PIP3, la fosforilación por PDKs y la ubiquitinación. Después de ser activada, Akt es capaz de translocar al núcleo donde puede influir sobre la actividad de algunos reguladores transcripcionales como CREB o NF- κ B.

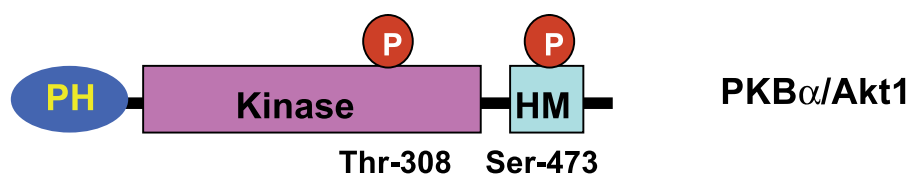


Figura 16. Estructura de los dominios de Akt. Posee el dominio kinasa en la región central de la molécula. El dominio PH actúa como módulo de unión a los fosfoinositoles fosforilados. El dominio hidrofóbico HM está localizado en el extremo carboxi terminal próximo al dominio kinasa. Los sitios de fosforilación en el loop de activación en los dominios kinasa e hidrofóbico están indicados (Hanada et al., 2004).

4.2.2. Proteínas quinasas C (PKC).

La familia PKC está constituida por serina/treonina quinasas que poseen una función crítica en la transducción de señales intracelulares. Hasta la fecha se han descrito en mamífero 12 miembros, que están implicados en multitud de procesos fisiológicos evidenciando que las PKC tienen un papel fundamental en la mitogénesis y proliferación celular, en la activación plaquetaria, en la remodelación del citoesqueleto, en la modulación de canales iónicos y en la secreción (Nishizuka, 1995). La primera PKC descubierta fue descrita como un enzima que podía ser activada *in vivo* e *in vitro* por la acción concertada de calcio, diacilglicerol (DAG) y un “factor de membrana” entonces no identificado (Kishimoto et al., 1980; Takai et al., 1979). Posteriormente la fosfatidilserina (PS) fue identificada como el cofactor de membrana requerido para la activación de todas las PKC (Chou et al., 1998). Actualmente esta familia se divide en tres grandes subfamilias de acuerdo a sus requerimientos de activación: las PKC clásicas (α , β I, β II y γ) que requieren calcio y DAG para su activación, las PKC nuevas (δ , ϵ , η y θ) que no necesitan calcio pero requieren DAG para ser activadas, y las PKC atípicas (ζ y ι/λ) que no son activadas ni por calcio ni por DAG.

Todas las subfamilias de PKC poseen diversos dominios reguladores cuyas funciones se han establecido gracias a un minucioso estudio bioquímico y mutacional. El dominio C1 contiene un motivo rico en cisteína, duplicado en la mayoría de las isoformas, que conforma el sitio de unión del DAG y de los ésteres de forbol (Bell and Burns, 1991). Este dominio es precedido por una región amino terminal que conforma el pseudosustrato autoinhibitorio (House and Kemp, 1987). El dominio C2 contiene el sitio de reconocimiento para ácidos lipídicos y, en algunas PKCs, el sitio de unión del calcio (Newton, 1995). Por último, los dominios C3 y C4 constituyen el dominio catalítico de la quinasa y son el lugar de unión para el ATP y el sustrato (Taylor and Radzio-Andzelm, 1994). El dominio pseudosustrato es muy parecido al motivo de

reconocimiento del sustrato óptimo y al unirse al bolsillo de unión del sustrato la PKC permanece autoinhibida, quedando éste protegido de la proteólisis cuando el enzima no está catalíticamente activo. En presencia de un sustrato, la PCK es activada por la retirada del pseudosustrato del sitio catalítico de la quinasa. Por ejemplo, el DAG se une al dominio C1 de la PKC liberando al enzima de su autoinhibición y, en consecuencia, favoreciendo la activación de la PKC y la fosforilación de sus sustratos. Se requiere la unión del cofactor PS al dominio C2 para que se produzca el cambio conformacional que provoca la salida del pseudosustrato del sitio catalítico (Orr et al., 1992; Orr and Newton, 1994a). En el caso de las PKC clásicas, la unión del calcio aumenta la afinidad del enzima por los fosfolípidos como la PS. Por lo tanto, la señal de Ca^{2+} /PS sinergiza con el DAG favoreciendo la interacción de la PKC con la membrana. Las PKC nuevas también requieren DAG y PS para su activación, pero han perdido el dominio C2 que une Ca^{2+} . Las PKC atípicas sólo tienen un dominio C1 pero no es activado en presencia de DAG y, al igual que las PKC nuevas, carecen del dominio C2 (Figura 17) (Toker, 1998).

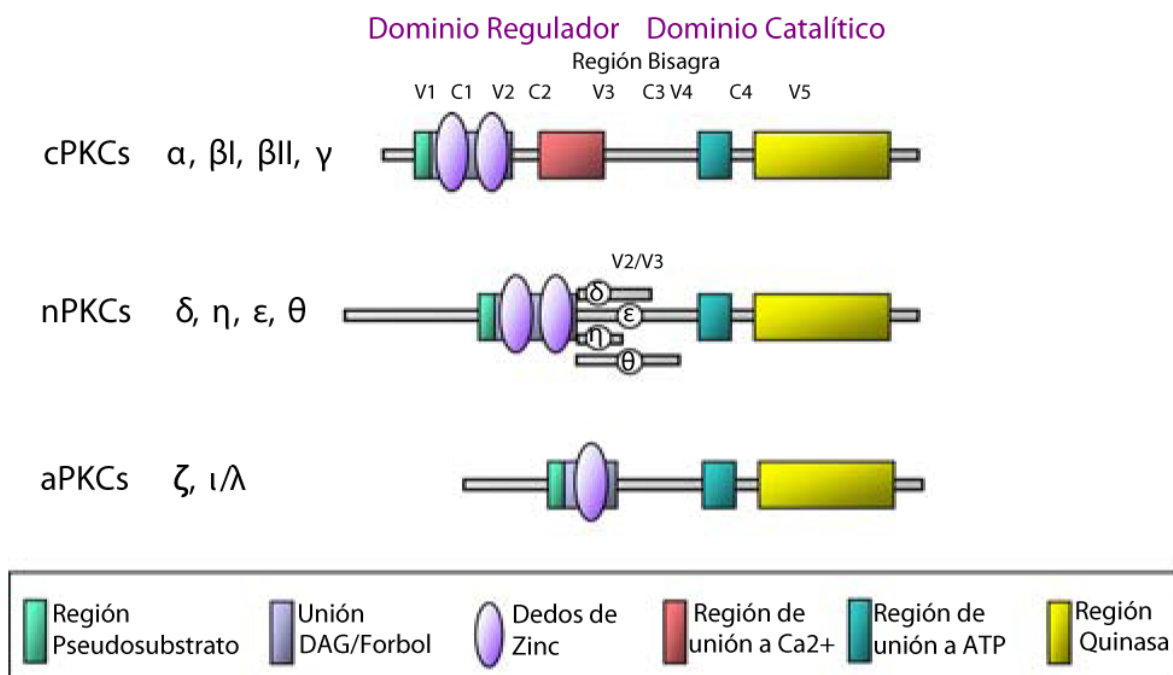


Figura 17. Esquema de la estructura primaria de las subfamilias de PKC. Comparación de la secuencia de las PKC clásicas, nuevas, atípicas y PKCμ/PKD. Aparecen indicados los diferentes dominios: pseudosustrato, regiones ricas en cisteína, unión de Ca^{2+} , catalítico, homología de plextrina, y transmembrana (Breitkreutz et al., 2007).

Tras el descubrimiento de las PKC como enzimas reguladas por lípidos, llevó mucho tiempo averiguar que la fosforilación del enzima tiene un papel crítico en su activación (Borner et al., 1989; Mitchell et al., 1989). En el dominio catalítico C4 se localizan tres residuos clave identificados como sitios de fosforilación, aunque se ha

descrito que la treonina 500 de la PKC β II (y su equivalente en las demás PKC) es el primero en fosforilarse y actúa como paso limitante en todas las PKC (Garcia-Paramio et al., 1998; Keranen et al., 1995; Orr and Newton, 1994b). Este lazo de treonina no puede sufrir autofosforilación, por lo que deben existir quinasas que lleven a cabo dicha reacción. Existen multitud de evidencias que demuestran que la PDK-1 es la encargada de cumplir esta función, siendo la responsable de la fosforilación del lazo de activación de las PKC clásicas (Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998). Una vez fosforilado el lazo de treonina, se requiere la fosforilación de los otros dos residuos clave presentes en el dominio catalítico, que tiene lugar por autofosforilación, como en el caso de las PKC clásicas, o por la acción de quinasas heterólogas. Estos dos residuos están conservados en todas las PKC de mamífero excepto en la PKC ζ y la PKC λ (isoforma de ratón) donde existe una sustitución de una serina por un glutamato en el que sería el segundo residuo de autofosforilación (Toker, 1998). A modo de resumen, el mecanismo de activación de las PKC clásicas y nuevas podría describirse en dos pasos secuenciales e igualmente necesarios: la fosforilación mediada por PDK-1 y la unión al segundo mensajero DAG. Se conocen un gran número de sustratos que pueden ser fosforilados, tanto *in vitro* como *in vivo*, por las PKC. Se ha establecido que la secuencia consenso de fosforilación es RXXS/TXRX, siendo necesaria la presencia de residuos básicos en los alrededores de la serina o treonina fosforilada (Nishikawa et al., 1997).

Respecto a las funciones fisiológicas de las PKC, éstas han sido implicadas de forma reiterativa en diversos procesos como la desensibilización de receptores, la modulación de eventos en la membrana celular, la regulación de la transcripción, la mediación de la respuesta inmune, la regulación del crecimiento celular, el aprendizaje y la memoria. Un factor clave para su función *in vivo* parece ser la distribución subcelular del propio enzima y de su sustrato (Mochly-Rosen, 1995). Tras la activación, cada isoforma se transloca a una región subcelular única donde se ancla a través de proteínas específicas denominadas RACKs (Disatnik et al., 1994; Mochly-Rosen, 1995), de manera que las diferentes isoformas de PKC se encuentran diferencialmente distribuidas dentro de la célula y específicamente dependiendo del tipo celular (Dekker and Parker, 1994). Estudios recientes sugieren que las PKC están implicadas en la regulación de la supervivencia celular (Barr et al., 1997; Berra et al., 1997; Murray and Fields, 1997; Whelan and Parker, 1998). Dependiendo del tipo celular la activación de las PKC puede tener consecuencias pro- o antiapoptóticas, lo que sugiere que pueden funcionar como sensores moleculares facilitando la supervivencia celular en condiciones favorables y promoviendo la muerte de células anormales o dañadas (Dempsey et al., 2000; Lucas and Sanchez-Margalet, 1995). Por ejemplo, la exposición de las células a estímulos

proapoptóticos como la radiación ultravioleta conlleva una disminución muy marcada en la actividad de las isoformas PKC ζ y/o PKC λ/ι (Berra et al., 1997). Estas dos PKC atípicas son efectores de la PI3K y son requeridas para la activación mitogénica en oocitos y fibroblastos sugiriendo que pueden estar encargadas de transmitir señales de supervivencia (Dempsey et al., 2000; Toker, 1998).

OBJETIVOS

El receptor P2X7 se localiza en una gran variedad de tejidos y se asocia a múltiples funciones. Dentro de la familia P2X, el receptor P2X7 tiene un papel relevante en el sistema nervioso central por su participación en procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo su implicación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, desordenes neuropsiquiátricos, regulación del crecimiento celular y progresión tumoral (Burnstock, 2013; Burnstock et al., 2011; Di Virgilio et al., 2009; Raffaghello et al., 2006; von Kugelgen and Wetter, 2000). En conjunto todas estas evidencias apuntan al receptor P2X7 como una posible diana farmacológica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o cancerosas, siendo necesario profundizar en los mecanismos implicados en la regulación de la expresión del receptor P2X7. En base a estos antecedentes, con esta tesis doctoral hemos pretendido profundizar en el conocimiento de la regulación de la expresión del receptor P2X7 a nivel transcripcional. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. Caracterizar un modelo celular óptimo de origen neural de fácil obtención, manipulación y mantenimiento de las células, que presentara una alta eficiencia de transfección para llevar a cabo numerosas aproximaciones moleculares, y que expresara de forma nativa un receptor P2X7 funcional.
2. Caracterizar en profundidad la región promotora mínima necesaria para inducir la expresión basal del gen *P2rx7* de ratón, así como identificar los factores de transcripción responsables de la expresión de dicho gen.
3. Analizar el efecto que ejercen los factores de transcripción previamente identificados sobre la regulación transcripcional del receptor P2X7 nativo.
4. Caracterizar las vías de señalización intracelular que participan en la regulación transcripcional del receptor P2X7 y analizar la participación de los factores de transcripción identificados en dicha señalización.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Instrumentación.

Todo el material y los aparatos utilizados tanto en la preparación de medios y disoluciones generales (Instrumentación general), como en la realización de técnicas Bioquímicas y de Biología Molecular más específicas vienen recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Relación de los diferentes aparatos utilizados.

Proceso experimental	Instrumentación y modelo	Casa comercial
Instrumentación general	Granatario Fx 2000	AND
	Balanza de precisión ER-60	AND
	Agitadores magnéticos Agimatic-S	Selecta
	Agitadores orbitales Luckham 802	Labnet
	pHmetros	Crison
	Pipétas automáticas	Eppendorf y Gilson
	Sistemas de filtración	Millipore
	Milli-Ro/Milli-Q	
	Microfuga 5414D	Eppendorf
	Centrífugas 5702 R y 5804 R	Eppendorf
	Baños termostatzados Tectron 3473100	Selecta
	Calentadores multibloque	Eppendorf
Cultivos celulares	Campana de flujo laminar horizontal AH-100	Tel-Star
	Autoclave alta capacidad	Selecta
	Placas y botellas de cultivo	Falcon
	Cubreobjetos de vidrio	Thermo Scientific
	Pipetas de aspiración Pipet-Aid	Drummond
	Pipetas estériles	Costar
	Incubador	Shel-Lab
	Filtros de 0,22 μ M Millex-GS	Millipore
	Jeringas estériles	Falcon
	Cámara de Neubauer	Deltalab
	Microscopio óptico	Nikon
	Lupa de aumento	World Precision Instruments
	Luz fría	Chiu technical Corporation

Microfluorimetría		
<i>Célula única</i>	Microscopio Eclipse TE-2000-E	Nikon
	Cámara ORCA-ER 42-98 CCD	Hamamatsu
	Objetivo S Fluor 40x 0,5-1,3	Nikon
	Monocromador con apertura de 10 nm Optoscan monocromator	Cairn Research
	Programa controlador Metafluor 6.3r & PC software	Universal Imaging Copr.
<i>Células en suspensión</i>	Fluorímetro LS-50B	Perkin Elmer
Expresión génica		
<i>Experimentos de luciferasa</i>	Lector de placas	FLUOstar OPTIMA
	Placas blancas	Costar
<i>Experimentos de ARN</i>	Espectrofotómetro	Eppendorf Biophotometer
	Termociclador GeneAmp2400	Applied Biosystems
	Sistema de visualización de geles Gel Logic 200 Imagin System	Kodak
	Equipo de PCR cuantitativa StepOne Plus Real Time PCR	Applied Biosystems
Técnicas inmunológicas		
<i>Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia</i>	Criostato	Leica
	Microscopio de fluorescencia	NIKON TE-2000-E
	Lámpara de Xenon	Nikon
	Cámara	Kappa DX2
	Software controlador	Kappa Image Base Control
	Microscopio confocal TCS SPE	Leica
	Software controlador LAS AF 2.5.1.5757	Leica
<i>Inmunotransferencia</i>	Sistema de electroforesis Mini-Protean 3	Bio-Rad
	Sistema de transferencia Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
	Máquina de revelado CP-1000	AGFA
Biología molecular	Placas estériles	Costar
	Incubador	Nüve
	Agitador orbital termostatzado	Thermo Scientific
	Mechero de gas	Selecta

2. Reactivos y productos químicos.

Todos los medios y soluciones se prepararon con sales inorgánicas Merck de grado analítico (pro anal.) disueltas en agua desionizada de alta calidad y pureza. En la Tabla 3 se detallan los compuestos y reactivos utilizados en cada uno de los ensayos realizados, así como las casas comerciales que los suministraron.

Tabla 3. Relación de reactivos utilizados.

Proceso experimental	Reactivo	Casa comercial
Cultivos celulares	Neurobasal, B27, solución de antibióticos/antimicóticos, Glutamax, tripsina	Gibco
	Glucosa, DMEM 4,5mM, RPMI, EBSS	Sigma
	Suero Fetal Bovino	EuroClone
	Papain Dissociation System	Whorthington
	Poly-L-lisina (0,1 mg/ml)	Biochrom AG
	Azul tripán, Poly-L-lisina (1 mg/ml)	Sigma
Farmacología		
<i>Agonistas y antagonistas purinérgicos</i>	α , β -meATP, CTP, BzATP, ATP, KN62, BBG	Sigma, Tocris
<i>Inhibidores de kinasas de las vías de señalización</i>	LY294002, GF-109203X, API-1, H89, SP600125, SB 202190, U0126, AG1478	Calbiochem
<i>Otros compuestos</i>	Mitramicina, EGF, ácido okadaico	Sigma, Calbiochem
Microfluorimetría		
<i>Sonda fluorescente de Ca²⁺</i>	Fura-2 AM	Molecular Probes
<i>Reactivos</i>	Triton X-100, Tris, EGTA, calcio	Sigma
Transfecciones	Lipofectamina 2000	Invitrogen
Experimentos de luciferasa	Dual-Luciferasa Reporter Assay System	Promega
Experimentos de ARN		
<i>Extracción y limpieza de ARN</i>	RNeasy Mini Kit	Qiagen/Biotools
	Turbo DNA-free	Ambion
<i>Geles</i>	Agarosa D1	Pronadisa
	SYBR-Safe DNA stain	Invitrogen
<i>RT</i>	M-MLV RT reagents, dNTP's	Invitrogen
<i>PCR</i>	AmpliTaQGold PCR Master Mix	Applied Biosystems
<i>Q-PCR</i>	TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems
<i>Inhibidores de ARNsas</i>	RNase-Zap	Sigma
Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica		
<i>Fijación y bloqueo</i>	p-formaldehído, suero de cabra, Tritón X-100, BSA y FBS	Sigma, Molecular Probes
<i>Anticuerpos primarios</i>	Anti-P2X7 (conejo)	Alomone, Chemicon
	Anti-Sp1 (conejo)	Millipore
	Anti-CD11 marcado con PE	Cortesía de Lisardo Boscá
<i>Anticuerpos secundarios</i>	Anti-IgG de conejo-Cy3 (burro)	Jackson
	Alexa 488 anti-IgG de conejo (cabra)	Invitrogen
<i>Tinción nuclear</i>	DAPI	Invitrogen
<i>Montaje</i>	Prolong	Invitrogen

Inmunotransferencia		
<i>Extracción y cuantificación de proteínas</i>	Tris, HCl, EDTA, Nonidet P40, Inhibidores de proteasas	Sigma, Merck,
	(Complete™), Benzona, NaF, VO43-	Roche, Calbiochem
	Reactivo Bradford	BioRad
	BSA	Sigma
<i>Electroforesis y transferencia</i>	Persulfato amónico, bis-acrilamida, SDS, Temed,	BioRad
	Glicina, patrones de peso molecular.	
	Tris, Azul de bromofenol	Merck
	Metanol	Lab-Scan
	Rojo Ponceau	Sigma
	Membranas de nitrocelulosa PROTRAN	Whatman
<i>Anticuerpos primarios</i>	Anti-P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X7 (conejo)	Alomone
	Anti-Sp1 (conejo)	Millipore
	Anti-histona (ratón), anti-GAPDH (ratón), anti-pAkt Ser437 (conejo), anti-Akt total, anti pGSK3 Ser21/9 (conejo), anti GSK3 total (ratón)	Cell Signalling
	Anti-pPKCζ Thr410 (ratón)	Santa Cruz
	Anti-αtubulina	Sigma
<i>Anticuerpos secundarios</i>	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra) y anti-IgG de ratón-HRP (conejo)	Dako
<i>Revelado de membranas</i>	Reactivo ECL	PerkinElmer
	Películas de autorradiografía.	Agfa
Biología molecular		
<i>Purificación de ADN genómico</i>	DNeasy Blood&Tissue Kit	Qiagen
<i>Purificación de plásmidos</i>	Hi Speed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
	Speedtools Plasmid DNA Purification Kit	Biotoools
<i>Purificación de PCR</i>	Speedtools PCR Clean-up Kit	Biotoools
<i>Marcadores de peso Molecular</i>	DirectLoad™ Wide Range	Sigma
<i>Bacterias</i>	Bacterias XL-1 Blue	Servicio de Fermentación (UAM)
<i>Medios bacterias</i>	Bactotripton, Extracto de Levadura, Agar	Pronadisa
	NaCl	Merck
	Ampicilina, X-Gal, IPTG	Sigma
<i>Mutagénesis</i>	QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
<i>Enzimas</i>	T4 DNA ligase y enzimas de restricción	Promega
	Pfu Hot Start polimerasa	Stratagene
	ADN Tth polimerasa	Biotoools
<i>Plásmidos</i>	pGEM-T easy, pGL4.23, pGL4.13, pGL4.10, pGL4.74[hRluc/TK]	Promega

	pIRES-EGFP, peGFP-C1	C l o n t e c h Laboratories
	Interferentes de Sp1	OriGENE
	Sobreexpresión de Sp1	Genome Cube
	pcDNA3-GSK3 β y pcDNA3-GSK3 β S9A	Cortesía de J.J. Lucas

3. Material biológico y modelos celulares.

3.1. Animales.

Para los cultivos de neuronas y astrocitos de corteza cerebral se emplearon ratones hembra gestantes de la cepa C57/BL6 suministradas por el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Para los estudios histológicos se utilizó la línea de ratones transgénicos *P2rx7*-EGFP generada en el U.S. National Institutes of Health Mutant Mouse Regional Resource Centers (stock 011959-UCD) (Gong et al., 2003) y amablemente cedida por la Dra. Maiken Nedergaard (University of Rochester Medical School, Nueva York, USA). Estos ratones expresan la proteína verde fluorescente EGFP bajo el promotor del gen *P2rx7* y han permanecido estabulados en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid con comida y agua *ad libitum*, temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los procedimientos con animales se hicieron en la Universidad Complutense de Madrid de acuerdo con las normativas europea y española (86/609/CEE; RD1201/2005) siguiendo las pautas indicadas por el Consejo Internacional de Animales de Laboratorio (ICLAS).

3.2. Líneas celulares.

En este trabajo se han utilizado dos líneas celulares de ratón: el neuroblastoma Neuro-2a (N2a) y la línea de macrófagos RAW 264.7. Las células N2a provienen de un clon establecido por R.J. Klebe y F.H. Ruddle a partir de un tumor espontáneo de la cepa A de ratón albino (Ruddle, 1969). Las células RAW 264.7 se establecieron a partir de un tumor inducido por el virus de ratón de leucemia Abelson, aunque no se ha detectado que la línea secrete partículas virales.

MÉTODOS

1. Cultivos celulares.

1.1. Aislamiento y cultivo de neuronas corticales.

Las neuronas de corteza cerebral se obtuvieron a partir de ratones C57BL/6 neonatos (P0-P1) o en estadio embrionario 18 (E18). Los cultivos se realizaron en base al método descrito por Dubinsky (1989) y por Banker y Goslin (1988), respectivamente, utilizando para ello el kit comercial de disociación de Papaína (Worthington Biochemical Corporation) que se ilustra esquemáticamente en la Figura 18. Las hembras gestantes se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los embriones por cesárea. Los ratones se sacrificaron mediante decapitación y las cabezas se llevaron al interior de una campana de flujo laminar, donde se sumergieron en etanol al 70% y se lavaron con medio Neurobasal estéril. A continuación, con ayuda de unas pinzas de microdissección estériles se extrajeron las cortezas cerebrales y se eliminaron cuidadosamente los restos de meninges y vasos sanguíneos. Una vez las cortezas cerebrales estuvieron completamente limpias se procedió a su disgregación mecánica con ayuda de cuchillas estériles. Inmediatamente después se añadió la solución de papaína a los tejidos y se mantuvieron durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente se recogieron los fragmentos con una pipeta pasteur estéril siliconizada, se pasaron a un tubo cónico de centrífuga de 15 ml y se finalizó la disgregación con 15 pases por la pipeta Pasteur hasta conseguir una mezcla homogénea, que se centrifugó 5 minutos a 37°C y 200xg. El sedimento resultante se resuspendió en una solución de ovomucoide, albúmina y DNasa y se colocó sobre la solución de inhibición (ovomucoide y albúmina). Se centrifugó de nuevo la mezcla 5 minutos a 37°C y 200xg, y el sedimento resultante se resuspendió en el medio de siembra de las neuronas compuesto por Neurobasal suplementado con FBS al 10%, penicilina (10 U/ml), estreptomicina (10 µg/ml), glutamina 0.5 mM y piruvato 1 mM. La viabilidad celular se determinó por exclusión del colorante vital Azul Tripán y el recuento de células en una cámara de Neubauer. Para ello se mezclaron 50 µL de la suspensión celular con 50 µL de Azul Tripán (1:1, v/v) y se llevó a la cámara de Neubauer para el recuento bajo el microscopio óptico. Se consideraron como células viables sólo aquellas capaces de excluir el colorante, contándose por tanto sólo las células no azules. Normalmente la viabilidad de las preparaciones superó el 95%. El número de células por mL se estimó según la relación:

$$\text{Nº células/ml} = \text{nº células contadas} \times 10^4 \times \text{dilución}$$

Tras el recuento, las células se diluyeron en medio de siembra hasta alcanzar la densidad deseada y se sembraron sobre placas de plástico estériles o cubreobjetos de vidrio medio de cultivo compuesto por Neurobasal suplementado con 10 U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina, 0.5 mM de glutamina, 1 mM de piruvato y B27 al 1% para permitir la diferenciación y el crecimiento neuronal. En este momento también se añadieron los fármacos que se iban a utilizar en el estudio cuando fuera necesario. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador de atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad y a una temperatura constante de 37°C.

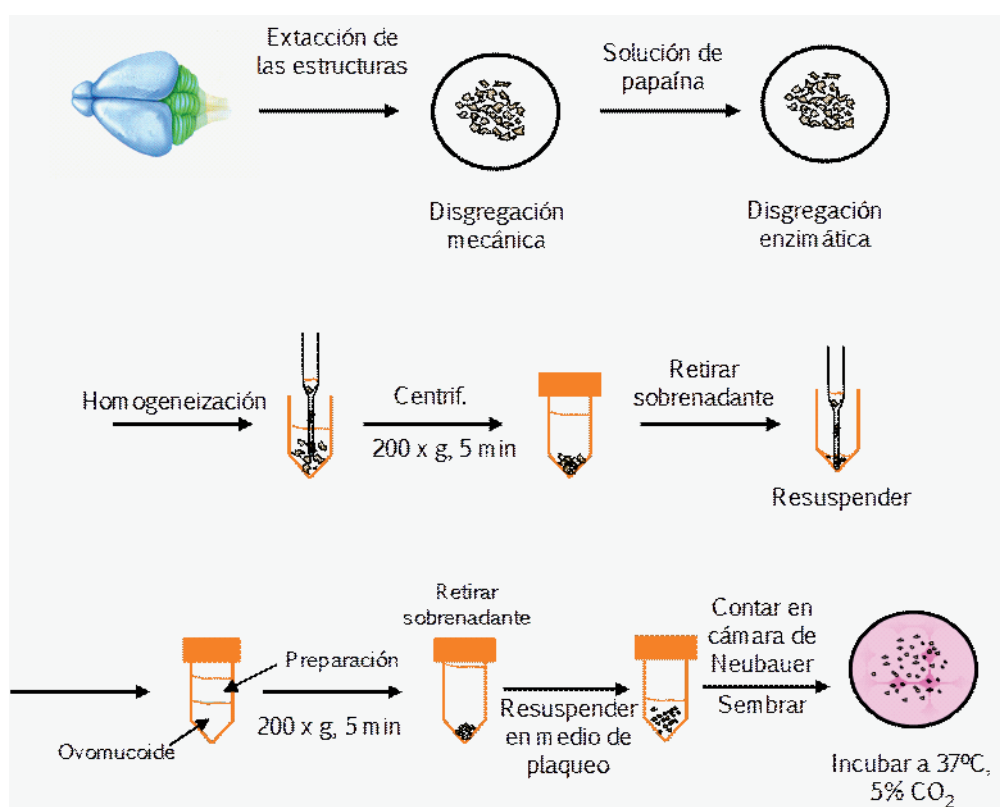


Figura 18. Representación esquemática de la obtención de neuronas de cerebro de ratón.

1.2.Cultivo de astrocitos corticales.

Para obtener los cultivos de astrocitos tipo 1 de corteza cerebral se llevó a cabo un proceso idéntico al descrito previamente con la única diferencia de que tras el recuento, las células se diluyeron en medio de cultivo DMEM suplementado con FBS al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de kanamicina y 2,5 µg/ml de anfotericina, y se sembraron en botellas de cultivo de 75cm² de tapón ventilado a una densidad de 8x10⁴ células/cm². Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador de atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad y a una temperatura constante de 37°C durante 10-12 días, reemplazando el medio cada 2-3

días. En estas condiciones de cultivo, las neuronas no sobreviven y sólo crecen los astrocitos y otras células gliales que se dividen hasta alcanzar la confluencia, momento en el que dejan de proliferar. Para purificar los astrocitos tipo 1, las botellas de cultivo se sometieron a agitación orbital a 250 rpm durante 18 horas a 37°C según el método descrito por McCarthy y de Vellis (1980). Finalizado el período de agitación, se retiró el medio de cultivo que contenía las células no viables, microglia y astrocitos tipo 2, quedando adheridos a la superficie de cultivo únicamente los astrocitos tipo 1. Las células se utilizaron durante los 5 días siguientes.

1.3.Cultivo de macrófagos peritoneales

Los macrófagos de peritoneo se obtuvieron a partir de ratones transgénicos *P2rx7-EGFP* de 10 semanas de vida a los que se les había inyectado 2,5 ml de tioglicolato al 3% (p/v) intraperitonealmente 60 h antes. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó un lavado del peritoneo con 10 ml de medio RPMI estéril para recoger los macrófagos. Este medio se mantuvo a 4°C con el fin de evitar la adhesión de las células al tubo. Las células se centrifugaron a 200xg durante 10 min y el sedimento se lavó dos veces con 25 ml de PBS estéril frío. Las células se sembraron sobre cubreobjetos a una densidad 2×10^5 células/cm² en medio RPMI suplementado con 10% de FBS y antibióticos. Transcurridas 3 h a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ se cambió el medio retirando así las células que no se habían adherido a la superficie. Las células se mantuvieron en medio RPMI suplementado dentro de un incubador de atmósfera controlada de CO₂ al 5%, saturada de humedad y a una temperatura constante de 37°C (Velasco et al., 1997).

1.4.Cultivo de líneas celulares N2a y RAW 264.7.

Las células se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 10%, glutamax®, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Las células se conservan congeladas a -80°C en FBS al 10% de DMSO en el caso de las N2a y en DMEM completo al 10% de DMSO en el caso de las RAW 264.7. Para el mantenimiento de la línea se dieron pases cada dos o tres días tripsinizando las células de las botellas de cultivo y tras recoger las células y centrifugar, se resembraron en pases 1:3-1:6 según las necesidades.

2. Determinación fluorimétrica de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

2.1. Estudios microfluorimétricos en células individuales.

La concentración de Ca^{2+} citosólico libre en células de neuroblastoma murino N2a se determinó utilizando un método microfluorimétrico empleando la sonda fluorescente Fura-2, según la técnica descrita por Grynkiewicz y col. (Grynkiewicz et al., 1985). Este indicador fluorescente es un compuesto polianiónico hidrofílico que une Ca^{2+} de forma específica. En los ensayos se utilizó la forma acetoximetil éster (Fura-2 AM) capaz de atravesar la membrana plasmática de las células debido a su naturaleza hidrofóbica. Una vez en el citosol, las esterasas inespecíficas rompen el enlace éster de modo que el Fura-2 liberado queda confinado en el interior celular donde une el calcio libre para formar el complejo Fura- Ca^{2+} . La formación de este complejo da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se registra a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose al mismo tiempo un desplazamiento hacia el ultravioleta del máximo del espectro de excitación, de 380 a 340 nm (Figura 19).

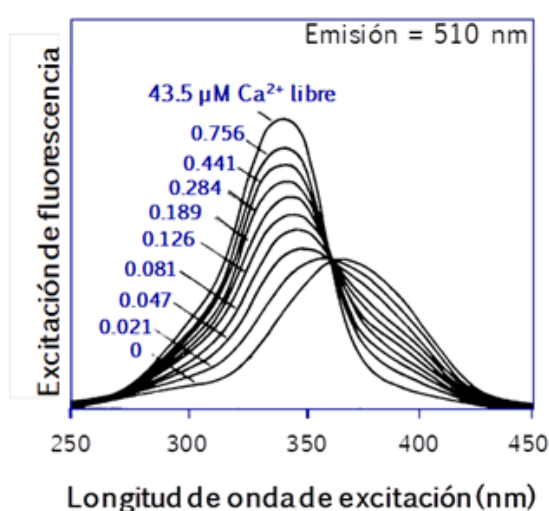


Figura 19. Espectros de excitación de la sonda fluorescente de Ca^{2+} Fura-2 en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

Para medir las variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular en células N2a, el día anterior se sembraron $2,5 \times 10^5$ células en placas de 35 mm que contenían tres cubreobjetos tratados con poli-L-lisina. El día del experimento los cubreobjetos se lavaron con solución de Locke (composición: NaCl, 140 mM; KCl 4,5 mM; CaCl_2 , 2,5 mM; KH_2PO_4 , 1,2 mM; MgSO_4 , 1,2 mM, glucosa 5,5 mM; HEPES, 10 mM a un pH 7,4) y se incubaron en Locke conteniendo la sonda Fura-2 AM en oscuridad durante 45 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, cada cubreobjetos se lavó con Locke y se colocó con ayuda de grasa de vacío a la parte inferior de una cámara de perfusión. Esta cámara se conectó a tubos de silicona de entrada y salida de la solución de perfusión y se situó en la platina de un microscopio de fluorescencia. El tubo de entrada de la perfusión se acopló a un dispositivo de termostatación para conseguir que el medio de perfusión llegase a la cámara a una temperatura constante de 37°C. El flujo de entrada se mantuvo a aproximadamente 1,5 ml/min por diferencia de presión hidrostática al situar las soluciones de perfusión a una altura suficiente por encima de la cámara de perfusión. Tras atravesar la cámara, el medio de perfusión se aspiró de forma continua gracias a una bomba de vacío. Este sistema de perfusión continua evita que se acumule cualquier metabolito que pueda salir de las células durante la perfusión, o bien, cualquier producto de degradación de los fármacos aplicados.

Una vez situada la cámara de perfusión sobre el microscopio, las células se iluminaron alternativamente con luz de 340 y 380 nm procedente de un monocromador de ancho de banda 10 nm. La selección de las longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de una solución de Fura-2 saturada de calcio (340 nm) y de una solución de Fura-2 sin calcio (380 nm), respectivamente. El haz de luz monocromada se condujo desde una rueda de filtros hacia el microscopio con una guía líquida. La luz es reflejada hacia el objetivo mediante un espejo dicróico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. De este modo, sólo alcanzan la muestra las longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm, mientras que la luz fluorescente emitida por el Fura-2 a 510 nm atraviesa el espejo dicróico y es conducida hacia la cámara ORCA-ER C 47 42-80 de Hamamatsu, después de pasar por un filtro interferencial de paso de banda centrado a 510 nm. El tiempo de exposición de cada longitud de onda fue de 250 ms y el tiempo que tardaba en cambiar de una longitud de onda a la otra fue inferior a 5 ms (Figura 20).

Las células se estimularon durante 40 s con los distintos compuestos purinérgicos a las siguientes concentraciones: α,β -meATP 100 μM , CTP 300 μM , BzATP 100 μM y ATP 100 μM . En los estudios en los que aplicaron antagonistas de P2X7, éstos se

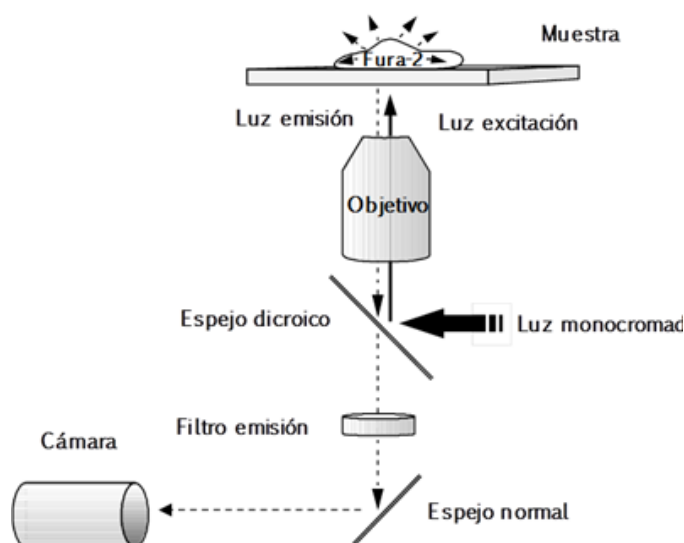


Figura 20. Esquema representativo del sistema de microfluorimetría. La luz de excitación proviene de una rueda de filtros que emite exclusivamente a la longitud de onda deseada (340 o 380 nm). El haz de luz monocromada llega al microscopio a través de una guía líquida, se refleja en un espejo dicróico centrado en 430 nm y alcanza la preparación a través del objetivo del microscopio. La luz fluorescente emitida por el Fura-2 intrasinaptosomal o intracelular es capturada por el objetivo, atraviesa el espejo dicróico (> 430 nm) y se dirige hasta el filtro de emisión centrado en 510 nm. Por último, el haz de luz llega a la cámara CCD.

preincubaron durante 5 min a las siguientes concentraciones KN62 50 nM, BBG 1 μ M y A438079 1 μ M. En aquellos experimentos en los que se empleó solución de Locke sin Mg^{2+} , se reemplazó el $MgSO_4$ por glucosa para mantener la osmolaridad. Las células se visualizaron a través de un objetivo de fluorescencia NIKON 20x. Todo el equipo estuvo controlado por un ordenador con un software MetaFluor 6.3r6 PC.

Los registros de fluorescencia que se muestran corresponden a la relación existente entre la fluorescencia a 340 y 380 nm (F_{340}/F_{380}) en función del tiempo de una región elíptica situada sobre cada célula analizada (Figura 21). El cociente de fluorescencia F_{340}/F_{380} aumenta conforme se incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular. Antes de calcular la razón existente entre las dos longitudes de onda, se sustrajo a la sucesión de imágenes recogidas para cada longitud de onda el valor de fluorescencia basal obtenido en cada caso.

2.2.Determinación de la concentración de Ca^{2+} citosólico en células en suspensión.

Para realizar estos ensayos se utilizaron células N2a en suspensión obtenidas tras la tripsinización de cultivos confluentes en botellas de 75 cm^2 . Las células se

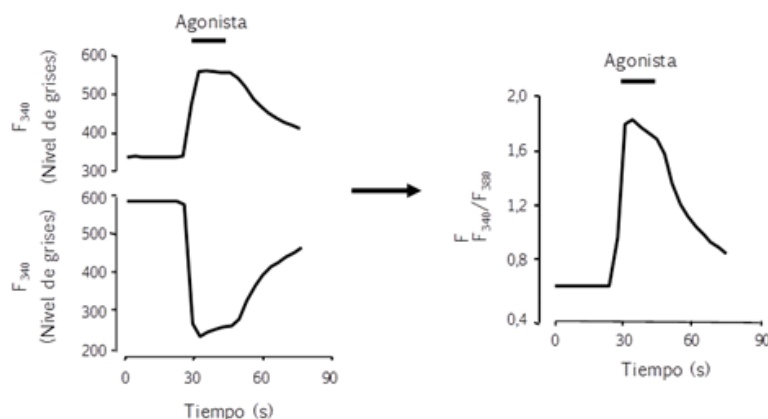


Figura 21. Cálculo de la relación de fluorescencias a cada tiempo medidas a 340 y 380 nm. Los registros temporales de fluorescencia obtenidos para cada longitud de onda de excitación (340 y 380 nm) se dividen entre sí para obtener la ratio de fluorescencia F_{340}/F_{380} .

centrifugaron a 150xg durante 5 minutos y se resuspendieron en medio Locke. A continuación, las células se incubaron durante 45 min a 37°C con la sonda fluorescente en Locke suplementado con 5 μ M de la sonda fluorescente de calcio Fura-2 AM y 1mg/ml de BSA. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con Locke y se resuspendieron a una densidad de 10^6 células/ml. Posteriormente alícuotas de 750 μ l de dicha suspensión celular se centrifugaron 1 minuto a 15.000xg, se resuspendieron en 1,5 ml de Locke y se colocaron en cubetas termostatzadas a 37°C con agitación continua en un fluorímetro. La intensidad de fluorescencia se determinó usando una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 510 nm.

Los valores de fluorescencia mínima y máxima, necesarios para transformar los datos de fluorescencia en concentraciones de calcio, se obtuvieron mediante el protocolo que se describe a continuación. El Ca^{2+} extrasinaptosomal se quela gracias a la adición de una mezcla de EGTA/TRIS (5 mM y 30 mM respectivamente). A continuación, se añade una solución de Triton X-100 al 0,2%, que produce la rotura de los sinaptosomas, obteniendo así el valor mínimo de fluorescencia o F_{\min} que corresponde al nivel de fluorescencia que existe cuando todo el Fura-2 está libre de Ca^{2+} . Por último, se añade a la cubeta un exceso de CaCl_2 (15 mM) para obtener la señal máxima de fluorescencia o F_{\max} que coincide con el valor de fluorescencia existente cuando todo el Fura-2 está unido a Ca^{2+} (Figura 22).

La toma de datos se realizó cada 0,5 s y se exportaron a un ordenador acoplado en línea, donde se procedió al análisis matemático de los registros de fluorescencia.

La concentración de Ca^{2+} intrasinaptosomal fue calculada, a partir de las medidas de fluorescencia, con la siguiente ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left[\frac{F_t - F_{\min}}{F_{\max} - F_t} \right]$$

donde F_t es la fluorescencia a cada tiempo y F_{\min} y F_{\max} son la fluorescencia mínima y máxima, respectivamente. El valor de la constante de disociación, K_d , para el complejo Ca^{2+} /Fura-2 a 37°C y pH 7,4 se estimó en 224 nM según Grynkiewicz y col. (Grynkiewicz et al., 1985).

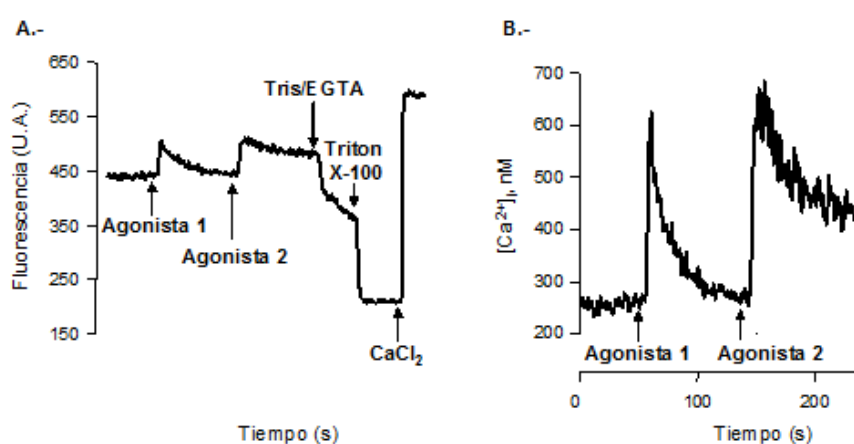


Figura 22. Registro fluorimétrico típico de Fura-2. Los valores de fluorescencia en unidades arbitrarias (A) pueden ser transformados en valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante la ecuación de Grynkiewicz (B).

3. Estudios de expresión génica.

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante cuantificación relativa de los transcritos expresados realizando análisis de RT-PCR en tiempo real. La manipulación de las muestras de ARN tuvo lugar en todo momento en condiciones libres de ARNasas.

3.1.Extracción y control de calidad de las muestras de ARN total.

La extracción de ARN total a partir de células en cultivo se realizó siguiendo el protocolo descrito en el kit comercial "RNeasy mini Kit", basado en la capacidad que tiene el ARN de unirse de forma específica a una columna de sílica gel cuando está en presencia de una elevada concentración de sal. En resumen, las células se sembraron en placas de 35 mm al 80% de confluencia. En el momento de la extracción del ARN se

aspiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron con PBS estéril. Se añadieron 350 µL del tampón de lisis RLT Plus conteniendo 0,1% β-mercaptoetanol sobre las placas y se rasparon para levantar todos los restos celulares. De esta forma se libera el contenido celular a la vez que se consigue una rápida inactivación de las ARNasas, evitando así la degradación del ARN presente en el lisado celular. Una vez completado el proceso de homogenización, se añadió etanol al 70% para favorecer la lisis y crear unas óptimas condiciones de unión a la columna. A continuación se procedió a la purificación del ARN siguiendo las pautas descritas por el fabricante en el protocolo de extracción. Una vez finalizada la extracción del ARN total, se procedió a la incubación de las muestras en presencia de ADNasa I libre de ARNasas durante 1 h a 37°C con el fin de eliminar el ADN contaminante. Finalizado el tiempo de incubación se inactivó la ADNasa y se recuperó la fracción de ARN total altamente purificada.

La concentración de ARN se determinó cuantificando la absorbancia a 260 nm de las muestras obtenidas en el espectrofotómetro. El grado de pureza del ARN se estimó a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}), el cual, para una disolución de ARN puro, debe tener un valor igual o muy próximo a 2.

3.2.Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg de ARN total extraído de la muestra correspondiente se realizó utilizando la enzima transcriptasa inversa del virus de leucemia murina M-MLV, 6 µg de cebadores de secuencia aleatoria y 350 µM de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). La reacción se desarrolló durante 90 minutos a 37°C, seguida de una incubación a 70°C durante 15 minutos con el fin de inactivar el enzima.

Para analizar la expresión de los receptores P2X en células N2a se llevaron a cabo ensayos de PCR utilizando la ADN polimerasa AmpliTaq Gold® en forma de mezcla de reacción comercial o “*Master Mix*” (que contiene los dNTPS, el tampón de reacción y la polimerasa), una pareja de oligonucleótidos específicos y 5 µl del ADNc previamente obtenido, en un volumen final de reacción de 25 µL. Los oligonucleótidos para los receptores murinos P2X1, 2, 3, 4, 5 y 7, así como los de los controles endógenos β-actina y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fueron comerciales. Los oligonucleótidos específicos para el receptor P2X6 de ratón se diseñaron con ayuda del programa Primer Express 3.0: cebador sentido 5'-AGGGCAGATGTCCAGAGCAT-3';

cebador antisentido 5'-GTCTTCATCAGCCCAGCAGTT-3'. Las reacciones de amplificación implicaban un paso inicial de desnaturalización y activación de la AmpliTaq Gold ADN polimerasa de 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones de desnaturalización, anillamiento y elongación: 94°C, 30 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos, respectivamente. Una vez completados los 40 ciclos, se realizó un paso de extensión final durante 7 minutos a 72°C para facilitar la completa elongación de todos los fragmentos amplificados durante la reacción de PCR. Cada reacción de PCR se realizó en paralelo con un control sin ADN molde para asegurar la ausencia de contaminaciones cruzadas. Una vez finalizadas las reacciones de PCR, la separación e identificación de los productos de amplificación resultantes se realizó utilizando geles de agarosa al 1-2%, teñidos con el marcador de ADN *SYBR Safe*. Como marcador de peso molecular se utilizó el patrón de ADN comercial PCR 100 bp Low ladder. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes Gel Logic 200 Imaging System con exposición a luz ultravioleta.

3.3.PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

La utilidad de esta técnica para cuantificar la expresión de un determinado gen o genes en una muestra de ADN se basa en la relación directa que existe entre la cantidad de ADN molde inicial y el producto que se amplifica a partir del mismo. De esta forma a mayor cantidad de ADN molde, más temprana será la aparición del producto amplificado. El seguimiento del proceso de amplificación se llevó a cabo mediante el uso de sondas de hibridación TaqMan® que, al estar unidas a moléculas fluorescentes, permiten cuantificar los productos que se van sintetizando durante el transcurso de la reacción (Figura 23).

A medida que los ciclos de PCR avanzan, aumenta el número de copias de producto generado, por lo que la intensidad de la fluorescencia emitida aumentará también de forma proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado. El termociclador detecta el incremento de fluorescencia y lo representa frente al número de ciclos de la PCR. Durante los primeros ciclos de amplificación no hay incremento de fluorescencia (ΔR_n) ya que es necesario que se acumule una cantidad mínima de producto amplificado. El ciclo de PCR en el que se acumula suficiente producto amplificado como para que el valor de fluorescencia se eleve por encima de la fluorescencia basal, se define como ciclo umbral o “*cycle threshold*” (Ct). El valor del Ct es proporcional al logaritmo de la cantidad inicial de ADN molde (Figura 24).

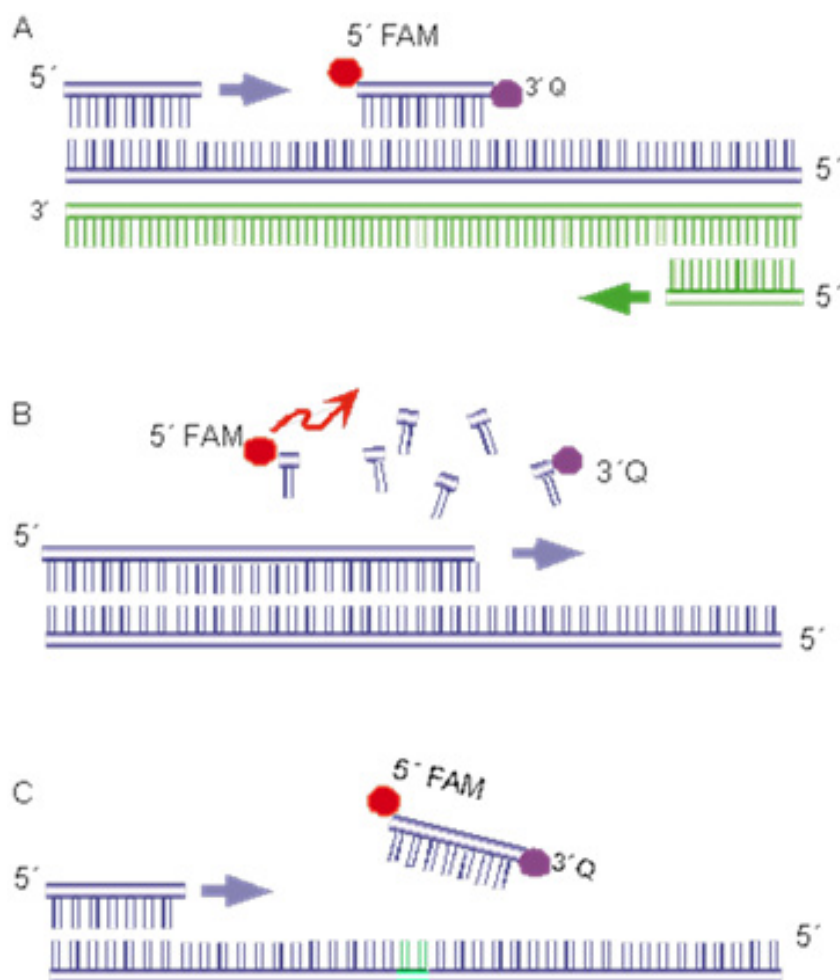


Figura 23. Esquema de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de una Q-PCR. La sonda hibrida de forma específica con el amplicón deseado en una región interna del mismo, el cual queda localizado entre los cebadores sentido y antisentido. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo reportero FAM y en el extremo 3' con un apagador o “quencher” que absorbe la emisión de fluorescencia del extremo 5'. Durante el proceso de extensión de la cadena que se está sintetizando, la ADN polimerasa termoestable con actividad 5'-3' exonucleasa hidroliza la sonda en su extremo 5'. De esta forma el reportero se libera, la fluorescencia que emite no es absorbida por el apagador y su emisión es detectada por el termociclador.

Los ensayos de Q-PCR se llevaron a cabo a partir de muestras de ADNc obtenidas previamente utilizando la mezcla de amplificación o “Master Mix” TaqMan® Fast Universal PCR. Se utilizaron sondas fluorescentes TaqMan® marcadas con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y con el quencher NFQ-MGB en el extremo 3'. Para todos los genes ensayados, excepto para P2X6, se utilizaron oligonucleótidos y sondas específicos comerciales. Los oligonucleótidos y la sonda específicos para el receptor P2X6 de ratón se diseñaron con ayuda del programa Primer Express

3.0: cebador sentido 5'-AGGGCAGATGTCCAGAGCAT-3'; cebador antisentido 5'-GTCTTCATCAGCCCAGCAGTT-3'; sonda FAM-5'-CTTCCGTTCTCTGGC-3'-MGB. El ensayo de amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en un volumen final de 25 μ l, conteniendo la mezcla comercial de cebadores y sonda correspondiente, 0,75 ng de ARN de transferencia, la "Master Mix" TaqMan® Universal PCR (que contiene los dNTPS, el tampón de reacción y la AmpliTaq Gold® polimerasa) y 5 μ l del ADNc correspondiente. La reacción se desarrolló en un programa de 2 pasos: una incubación inicial a 95°C durante 20 segundos para la activación de la polimerasa seguida de 40 ciclos de amplificación: (1 s de desnaturalización a 95°C y 20 s de hibridación a 60°C). La cuantificación de la expresión de cada transcrito se realizó interpolando los valores de Ct de cada muestra en una recta patrón. Para construir cada recta patrón, se hicieron diluciones seriadas a partir de una PCR clásica realizada con las mismos oligonucleótidos utilizados en la Q-PCR y utilizando como molde 5 μ l de ADNc. Como control interno de amplificación se analizó la expresión de los genes constitutivos β -actina o GAPDH en todas las muestras obtenidas.

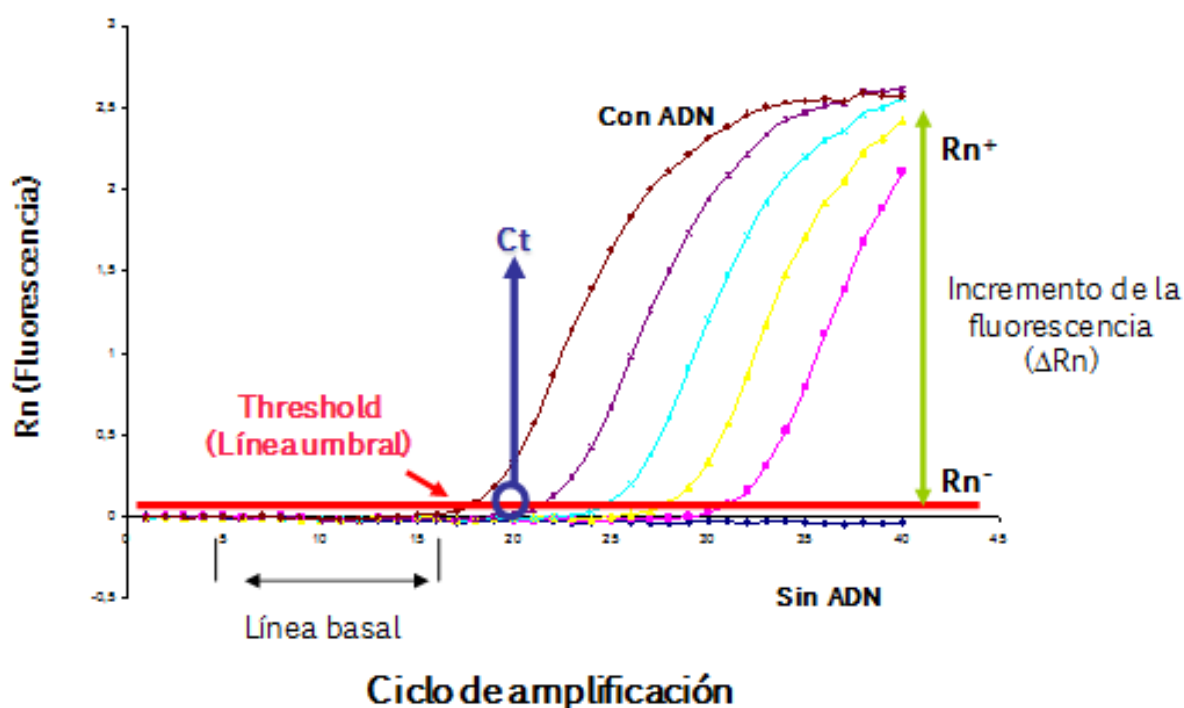


Figura 24. Modelo de las curvas obtenidas en una reacción de Q-PCR. La línea roja indica la línea basal o threshold. En azul se muestra el punto considerado como el valor de Ct. Este valor coincide con el número de ciclos de amplificación en la reacción de PCR necesarios para iniciarse el incremento exponencial de fluorescencia (Rn).

4. Inmunotransferencia o “*Western blot*”.

4.1.Extracción y cuantificación de proteínas.

La extracción de proteínas totales se hizo a partir de cultivos de células N2a, neuronas corticales y astrocitos corticales que habían sido previamente transfectadas o tratadas con diferentes fármacos. Una vez realizado el tratamiento, se retiró en su totalidad el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS a 4°C. A continuación las células se recogieron en tampón de lisis a 4°C compuesto por PBS conteniendo 137mM de NaCl, 2,6mM de KCl, 1,5mM de KH_2PO_4 y 8,1mM de Na_2HPO_4 . El extracto celular se transfirió a un tubo de microcentrífuga donde se mantuvo 1 h en agitación a 4°C y, posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y 15.000 xg para recoger el sobrenadante que contenía el extracto total de proteínas.

En ocasiones se realizó un fraccionamiento subcelular para la obtención de extractos proteicos citosólicos y nucleares de forma independiente de células N2a en cultivo. Para ello se retiró el medio de cultivo de las placas y se realizó un lavado con PBS a 4°C. A continuación las células se tripsinizaron y se recogieron en un tubo de microcentrífuga. El tubo se centrifugó durante 1 min a 4°C y 1500xg. A continuación se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis a 4°C compuesto por PBS conteniendo Nonidet P-40 al 1% (v/v), 1 mM de ortovanadato sódico, 50 mM de NaF, 0,5 mM de EDTA, glicerol al 10% (v/v), 1 mM de DDT, 0,2 mg/ml de PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas comercial. Posteriormente, el tubo se centrifugó durante 1 min a 4°C y 4000xg y el sobrenadante se guardó como fracción citosólica. Tras hacer un lavado con el mismo tampón de lisis, el sedimento se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis conteniendo 1 µl de benzonasa®, obteniendo así la fracción nuclear.

La cuantificación de los extractos proteicos se realizó mediante el método de Bradford (1976). Este método se basa en el cambio de la absorbancia máxima que experimenta el colorante Azul de Coomassie cuando se une a las proteínas, pasando de 465 nm a 595 nm. La concentración de proteínas en las muestras problema se calculó interpolando los valores de absorbancia medidos a 595 nm en una recta patrón de albúmina de suero bovino (BSA). Una vez conocidas las concentraciones de proteínas presentes en cada una de nuestras muestras se realizaron los cálculos necesarios para cargar la misma cantidad de proteína en cada uno de los pocillos del gel de electroforesis.

4.2. Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de las membranas.

Como primer paso se mezcló un volumen de cada extracto conteniendo entre 20-30 μg de proteínas solubilizadas con el tampón de carga concentrado 5 veces y cuya composición es la siguiente: 57% (v/v) glicerol, 125 mM Tris-HCl 1 M pH 6,8, 10% (p/v) SDS, 0,5% (p/v) Azul de Bromofenol. En estas condiciones las muestras se calentaron a 99°C durante 5 minutos en un calentador multibloque y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida del porcentaje (p/v) requerido en cada caso, en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Uno de los pocillos del gel se reservó para una mezcla de patrones coloreados de peso molecular conocido. La electroforesis se desarrolló en un sistema mini-Protean 3 a un voltaje constante de 90 V y en tampón de electroforesis cuya composición es la siguiente: 25 mM Tris, 200 mM glicina y 0,1% SDS, pH 8,3. Tras la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa previamente hidratadas durante 5 minutos en tampón de transferencia, utilizando un sistema mini-Trans Blot, a una intensidad de 240 mA durante 75 minutos. La composición del tampón de transferencia fue la siguiente: 192 mM glicina, 25 mM Tris y 20% (v/v) de metanol, pH 8,3. Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante 10 minutos con el colorante rojo Ponceau que se une a las proteínas para comprobar la correcta separación y transferencia de éstas. Posteriormente, las

Tabla 4. Anticuerpos y diluciones empleadas en Western Blot

Anticuerpo primario	Dilución empleada	Anticuerpo secundario y dilución
Anti P2X1	1/200	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti P2X2	1/200	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti P2X3	1/500	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti P2X4	1/500	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti P2X5	1/400	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti P2X6	1/200	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti P2X7 intracelular	1/1000	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti α tubulina	1/10000	Anti IgG de ratón-HRP 1/5000 (conejo)
Anti Sp1	1/1000	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti GAPDH	1/5000	Anti IgG de ratón- HRP 1/2000 (conejo)
Anti Akt-total	1/1000	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti pAkt Ser473	1/1000	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti pPKC ζ Thr410	1/500	Anti IgG de ratón-HRP 1/1000 (conejo)
Anti pGSK3 Ser21/9	1/1000	Anti IgG de conejo- HRP 1/1000 (cabra)
Anti GSK3 total	1/1000	Anti IgG de ratón-HRP 1/5000 (conejo)

membranas se lavaron con agua destilada para eliminar el colorante y se incubaron en agitación durante 1h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo compuesta por: TBS (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5) conteniendo Tween-20 al 1% (v/v) y BSA al 3% ó leche en polvo desnatada al 5%. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario preparado en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. La relación de los anticuerpos empleados y las concentraciones utilizadas quedan reflejados en la Tabla 4. Tras este paso, el exceso de anticuerpo primario se lavó con tampón TBS-Tween 0,1% y se realizó la incubación durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa (en función del anticuerpo primario utilizado se utilizó anti-IgG-HRP de ratón o conejo). Transcurrido este tiempo, el exceso de anticuerpo secundario se lavó con TBS-Tween y el revelado se llevó a cabo incubando la membrana durante 2 minutos con el reactivo “Western Lightning Chemiluminescence”. Este sistema se basa en la oxidación que ejerce el luminol presente en el reactivo sobre la peroxidasa ligada al anticuerpo secundario, generándose una emisión de luz que puede ser detectada por las membranas radiográficas o sistemas de imagen. En este trabajo se emplearon películas de radiografía que se revelaron en una máquina CP 1000. El densitometrado de las bandas de proteína se llevó a cabo escaneando las películas reveladas y cuantificando la intensidad de los píxeles mediante el programa ImageJ.

5. Inmunocitoquímica.

Para los estudios de inmunocitoquímica se emplearon cubreobjetos de 15 mm donde se habían sembrado previamente las células N2a o los macrófagos peritoneales. Después de ser transfectadas o tratadas farmacológicamente, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 15 min con paraformaldehído (PFA) al 4% preparado en PBS. A continuación se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS y se bloquearon durante 1 h con PBS conteniendo suero de cabra al 5% y FBS al 10%. Tras el bloqueo, se realizaron 3 lavados con BSA al 3% en PBS, y a continuación, los cubreobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 1 h a 37°C o bien durante toda la noche a 4°C (Tabla 5). A continuación se realizaron 3 lavados con PBS-BSA 3% y se incubaron las células con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a 37°C. Se eligieron anticuerpos secundarios acoplados a diversos fluorocromos (FITC, Cy3, Alexa488, Alexa 594) en función de cada experimento. En los casos en los que los núcleos celulares se marcaron con DAPI, este compuesto se aplicó junto con los anticuerpos secundarios. Transcurrido este tiempo, se realizaron 2 lavados con PBS-BSA 3% y un tercero con PBS. Por último,

los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con el medio de montaje “*Prolong Antifade*”, que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Tras dejar secar el medio de montaje, las preparaciones se almacenaron en oscuridad a 4°C. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio de fluorescencia TE-200 o con un microscopio confocal TCS SPE System. El procesamiento posterior de las imágenes adquiridas se realizó con el programa ImageJ.

Tabla 5. Anticuerpos y diluciones empleadas en inmunocitoquímica.

Anticuerpo primario	Dilución empleada	Anticuerpo secundario
Anti P2X7 intracelular	1/200	Anti Cy3 de conejo 1/400 (burro) Alexa 594 de conejo 1/400 (cabra)
Anti Sp1	1/200	Anti Cy3 de conejo 1/400 (burro)
Anti CD11-PE	1/200	-
Anti α -tubulina	1/500	Alexa 488 de ratón 1/400 (cabra)

6. Inmunohistoquímica.

En estos ensayos se utilizaron ratones transgénicos *P2rx7-EGFP* que fueron sacrificados por decapitación el día de su nacimiento (P0) para la obtención del cerebro o a 10 semanas para la obtención del bazo. Seguidamente, se extrajeron el cerebro y el bazo de cada animal y se fijaron por inmersión en PFA al 4% en PBS durante 48 h a 4°C. Posteriormente, se lavaron con PBS a 4°C y se sometieron a un proceso de crioprotección consistente en la inmersión de los tejidos en una solución de sacarosa al 33% durante 48 h a 4°C (este tratamiento que evita la formación de cristales de hielo que pudieran dañar el tejido durante su congelación). Finalmente, se los tejidos se congelaron rápidamente en bloques de OCT (*Optimal Cutting Temperature médium*) y se guardaron a -80°C hasta el momento de ser cortados. Antes de realizar las secciones histológicas correspondientes, los bloques se dejaron aproximadamente 1 h en el criostato para que alcanzasen la temperatura óptima de corte. Se realizaron secciones longitudinales de 30 μ m de grosor, se recogieron sobre una solución de glicol y se guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para realizar las tinciones inmunohistoquímicas, las secciones de cerebro se lavaron con PBS y se mantuvieron en solución de bloqueo (1% de BSA, 5% de FBS y 2% de Tritón X-100 en PBS) durante 1 h. A continuación se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C (ver Tabla 6). Posteriormente las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario

y DAPI. Por último, los cortes se lavaron 3 veces con PBS, se extendieron sobre portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos rectangulares utilizando el medio de montaje FluoroSave™, que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Las imágenes se adquirieron con el microscopio confocal y se procesaron con el programa ImageJ.

Tabla 6. Anticuerpos y diluciones empleadas en inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Dilución empleada	Anticuerpo secundario
Anti P2X7 intracelular	1/200	Anti Cy3 de conejo 1/400 (burro)
Anti Sp1	1/200	Anti Cy3 de conejo 1/400 (burro)

7. Clonaje del promotor del gen *P2rx7* de ratón y construcción de los plásmidos reporteros de luciferasa.

7.1.Extracción del ADN genómico (ADNg).

Para llevar a cabo el clonaje de la región promotora del gen *P2rx7* de ratón, lo primero que se necesitó fue obtener ADNg de dicha especie. En esta tesis, el ADNg se extrajo de células de neuroblastoma murino N2a utilizando el kit de extracción de ADN “*DNeasy Blood & Tissue*”. El funcionamiento de este kit se basa en la unión selectiva del ADN a una membrana de sílice situada en el interior de una columna. La concentración de ADNg obtenida se cuantificó con un espectrofotómetro y la calidad del ADNg se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con “*SYBR Safe*”. A partir del ADNg extraído de células N2a, y teniendo como referencia la secuencia del gen *P2rx7* murino disponible en GeneBank (ID18439), se amplificó un fragmento de 3450 pb por PCR utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad de copia *Pfu Ultra™ Hot Start* y los siguientes oligonucleótidos: cebador sentido 5'-TGTTACGGCTGCATAGTCTGTCCT-3' y cebador antisentido 5'- GGATCCGGGTGACTTTGTTTGTCT-3'. Para comprobar el tamaño del dicho fragmento se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se recortó la banda correspondiente en el gel, purificándola después con un kit para la extracción de ADN de agarosa. El sitio putativo de inicio de la transcripción (TSS) se obtuvo a partir de las secuencias de ARNm disponibles en GenBank y que corresponden a los transcritos 1, 2, 3, y 4 (nº de acceso NM_011027, NM_001038845, NM_001038839, y NM_001038887, respectivamente).

7.2.Clonaje del fragmento en el vector pGEM®.

El vector de clonaje pGEM® contiene en sus extremos un nucleótido de timina que sobresale de la cadena complementaria (Figura 25). Estas timinas terminales hacen

que sea un sistema idóneo para clonar productos de PCR que han sido amplificados con enzimas con actividad deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT), por ejemplo la *Taq* polimerasa, que dejan un nucleótido de adenina en el extremo del fragmento amplificado favoreciendo así la ligación del vector con el fragmento de PCR.

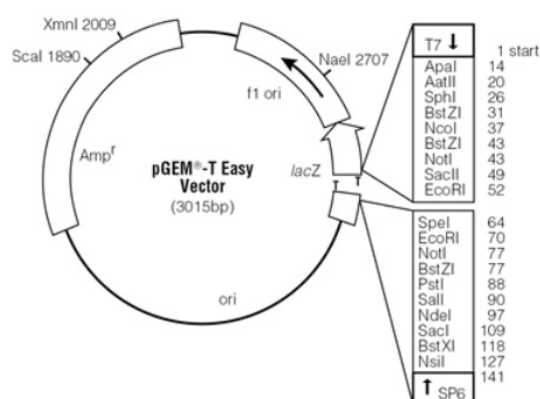


Figura 25. Vector pGEM®. Este vector contiene timinas terminales en los extremos 3' que facilitan el clonaje de productos de PCR. El fragmento clonado queda interrumpiendo el gen de lacZ lo que nos permite distinguir aquellas colonias que han incorporado en inserto por el color cuando las sembramos sobre placas que contienen X-Gal e IPTG. El vector contiene además, una resistencia a ampicilina.

Como la ADN polimerasa *Pfu Ultra™ Hot Start* que se utilizó para amplificar el fragmento de 3450 pb no posee actividad TdT, fue necesario incubar dicho fragmento purificado con un enzima con actividad deoxinucleotidil terminal transferasa, la ADN polimerasa Tth, en presencia de dATP durante 30 minutos a 70°C. De este modo, se añadió un nucleótido de adenina a cada extremo del fragmento amplificado para facilitar el clonaje en el vector pGEM®. A continuación se realizó la ligación del fragmento con el vector en presencia del enzima ligasa T4 durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se transformaron bacterias XL-1 Blue por choque térmico: 10 min a 4°C, 2 min a 42°C y 5 min a 4°C y se sembraron en placas de agar LB-Ampicilina con IPTG y X-Gal, manteniéndolas en un incubador a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron varias colonias blancas, que corresponden a las bacterias transformadas con el vector, y tras crecer en cultivo, purificar el plásmido y verificar por análisis de restricción, se eligieron dos colonias cuya secuencia se confirmó por secuenciación en el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid (UCM).

7.3. Clonaje en el vector pGL4.23®.

El vector pGL4.23® es un vector reportero de expresión eucariota que, además de contener el gen de la luciferasa de luciérnaga, posee un promotor mínimo que contiene una caja TATA de secuencia [AGACACTAGA GGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAG] (Figura 26A).

Partiendo del vector pGEM[®] que contiene el fragmento inicial de 3450 pb (pGEM-P2rx7) se amplificaron varios fragmentos de longitud decreciente que a su vez se subclonaron en el vector reportero de pGL4.23[®]. Para ello se diseñaron cebadores específicos conteniendo el sitio *Xho I* en los cebadores sentido y el sitio *Hind III* en los cebadores antisentido (Tabla 7). Los distintos fragmentos se amplificaron por PCR utilizando como molde el vector pGEM-P2rx7 y se purificaron con un kit de purificación de PCR siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR y el vector pGL4.23 se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas según cada caso. A continuación se ligó el vector digerido con cada uno de los fragmentos durante toda la noche a 4°C y a la mañana siguiente se transformaron bacterias XL-1 Blue por choque térmico y se sembraron en placas de agar LB-Ampicilina. Se seleccionaron algunas colonias y tras la obtención del ADN plasmídico y realización de un análisis por restricción, se secuenciaron.

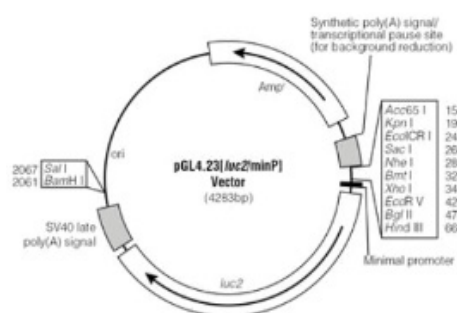


Figura 26. Vectores reporteros. (A) El vector pGL4.23, contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga, un promotor mínimo con una caja TATA y una resistencia a ampicilina, además del sitio de clonaje múltiple.

7.4. Mutagénesis dirigida.

La mutación dirigida de un par de nucleótidos consecutivos dentro de una determinada secuencia de ADN se llevó a cabo utilizando el kit *QuickChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis* siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se amplificó por PCR un fragmento de ADN tomando como molde el plásmido correspondiente y utilizando unos cebadores que contenían los nucleótidos modificados. A continuación, el producto de PCR se digirió con el enzima de restricción *Dpn I*, que reconoce exclusivamente el ADN metilado, es decir el ADN plasmídico sintetizado *in vivo*, pero no el amplificado por PCR. El éxito de la mutagénesis se confirmó mediante secuenciación y comparación con la secuencia original del plásmido correspondiente.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en el clonaje de los diferentes fragmentos del promotor del gen de P2rx7. Los sitios de restricción aparecen subrayados.

Nombre del fragmento	Oligonucleótidos	Tamaño
A	fw 5'-GGTTTGGAAATCAGGCAGCTAG-3' rv 5'-CGATTGAAGCTTGGTGACTTTGTTTGTCT-3'	2332 pb
B	fw 5'-GTGCTGGCTAGAGAGGGCTACA-3' rv 5'-CGATTGAAGCTTGGTGACTTTGTTTGTCT-3'	1795 pb
C	fw 5'-GTGGTCCCTCGCAACTATAGTC-3' rv 5'-CGATTGAAGCTTGGTGACTTTGTTTGTCT-3'	1256 pb
D	fw 5'-GATAATCTCTGTGGGGTGCGGT-3' rv 5'-CGATTGAAGCTTGGTGACTTTGTTTGTCT-3'	670 pb
E	fw 5'-GATAATCTCTGTGGGGTGCGGT-3' rv 5'-CATTAAGCTTGTGCTGTTTGAGACCTGTTC-3'	150 pb
F	fw 5'-GCAGCTCGAGCATCTAGGCCCTTGTCTGAG-3' rv 5'-CGATTGAAGCTTGGTGACTTTGTTTGTCT-3'	468 pb
G	fw 5'-CGCCCTCGAGGCAGTCACTGGAGGAACTGGAAG-3' rv 5'-CGATTGAAGCTTGGTGACTTTGTTTGTCT-3'	203 pb
F1	fw 5'-GCAGCTCGAGCATCTAGGCCCTTGTCTGAG-3' rv 5'-TTAAAAGCTTCCCTCCCCACCCCTTTTCCTTG-3'	110 pb
F2	fw 5'-AGGACTCGAGGTGGGGAGGGGGAATTTTAAAAATG-3' rv 5'-CAAGAAGCTTGTCTACAGGCCTGGCTGGCAG-3'	107 pb
F3	fw 5'-GCCACTCGAGCCTGTAGGACTTGGTTCTTG-3' rv 5'-TTCTAAGCTTGAACGGTTAACTTCCAGTTC-3'	100 pb
F2mut	fw 5'- GGAGGCTAGCGGGGCTTGGTCATCTGCCAGCC-3' rv 5'- GGCTGGCAGATGACCAAGCCCCGCTAGCCTCC-3'	107 pb
F3mut	fw 5'- GTTGCCAGGACCCGCAACCGCTGCAGTCACTGG-3' rv 5'- CCAGTGAAGTGCAGCGGTTGCGGGTCTGGCAAC-3''	100 pb
F2+F3	fw 5'-AGGACTCGAGGTGGGGAGGGGGAATTTTAAAAATG-3' rv 5'-TTCTAAGCTTGAACGGTTAACTTCCAGTTC-3'	207 pb

8. Plásmidos de sobreexpresión y silenciamiento de Sp1.

8.1. Vector de sobreexpresión de Sp1.

El ADNc del Sp1 murino fue amplificado a partir del plásmido comercial cuyo esqueleto es el pENTR223.1 (Nombre del Clon OCACo5052C0817D), diseñado para clonar mediante el sistema de *Gateway* y que contiene el gen de resistencia a la spectinomicina (Figura 27A). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR son las siguientes: cebador sentido 5'-CTAGCTCGAGATGAGCGACCAAGATCACTC-3';

cebador antisentido 5'-CTAGGAATTCTTAGAAACCAT TGCCACTGA-3' y contienen los sitios de restricción para *Xho I* y *EcoR I*, respectivamente. El producto de PCR se digirió con dichos enzimas de restricción y se subclonó en el vector de expresión eucariota pIRES2-EGFP®. Este vector contiene un sitio para la entrada de ribosoma del virus de la encefalomiocarditis localizado entre el sitio de clonaje múltiple y la EGFP permitiendo la expresión de dos proteínas independientes (en nuestro caso, Sp1 y la proteína reportera fluorescente EGFP) a partir de un mismo ARNm bicistrónico (Figura 28B). La fiabilidad de esta nueva construcción se confirmó mediante secuenciación.

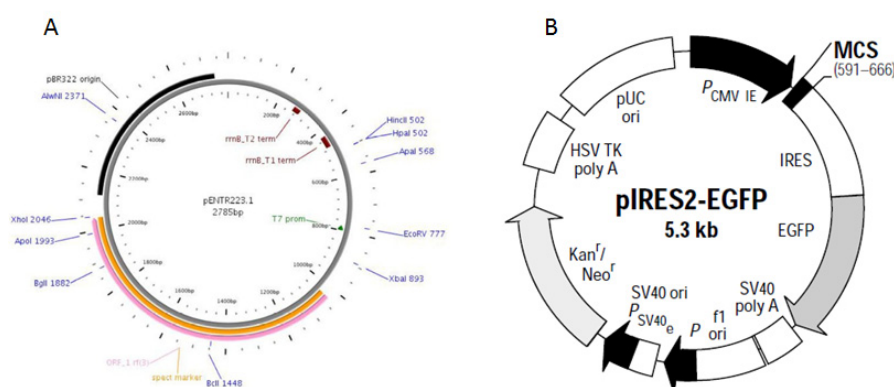


Figura 27. (A) Vector pENTR223.1. (B) Vector pIRES2-EGFP que permite sintetizar un ARNm bicistrónico.

8.2. Vectores de interferencia de Sp1.

Para el silenciamiento del factor transcripcional utilizamos vectores que expresaban ARN de interferencia. Estas secuencias están clonadas un vector de expresión de forma que al ser transcritos en la célula se genera una estructura en forma de horquilla con las secuencias sentido y antisentido de la región que queremos interferir. Esta estructura es reconocida por la enzima *Dicer*, que rompe la horquilla y produce los ARN de interferencia funcionales, que se unen a la secuencia correspondiente del ARNm conduciendo a su degradación por el complejo RISC (Figura 29).

Para la obtención de los ARN de interferencia o “*small hairpin RNA*” (shRNA) se utilizaron plásmidos comerciales basados en el vector pRFP-C-RS® (Figura 30). Los vectores HuSH pRFP-C-RS contienen turboRFP, un elemento que permite verificar la eficiencia de transfección rápidamente. Además incorpora cloranfenicol y puomicina para su selección. Las secuencias diana

utilizadas fueron shSP1.1 (5'-CCTTGCTACCTGTCAACAGCGTTTCTGCA-3') y shSP1.2 (5'-AGGACAGACTCAGTATGTGACCAATGTAC-3'). Para descartar un efecto no específico se utilizó una secuencia negativa o "scrambled" como control (5'-GCACTACCAGAGCTAACTCAGATAGTACT-3').

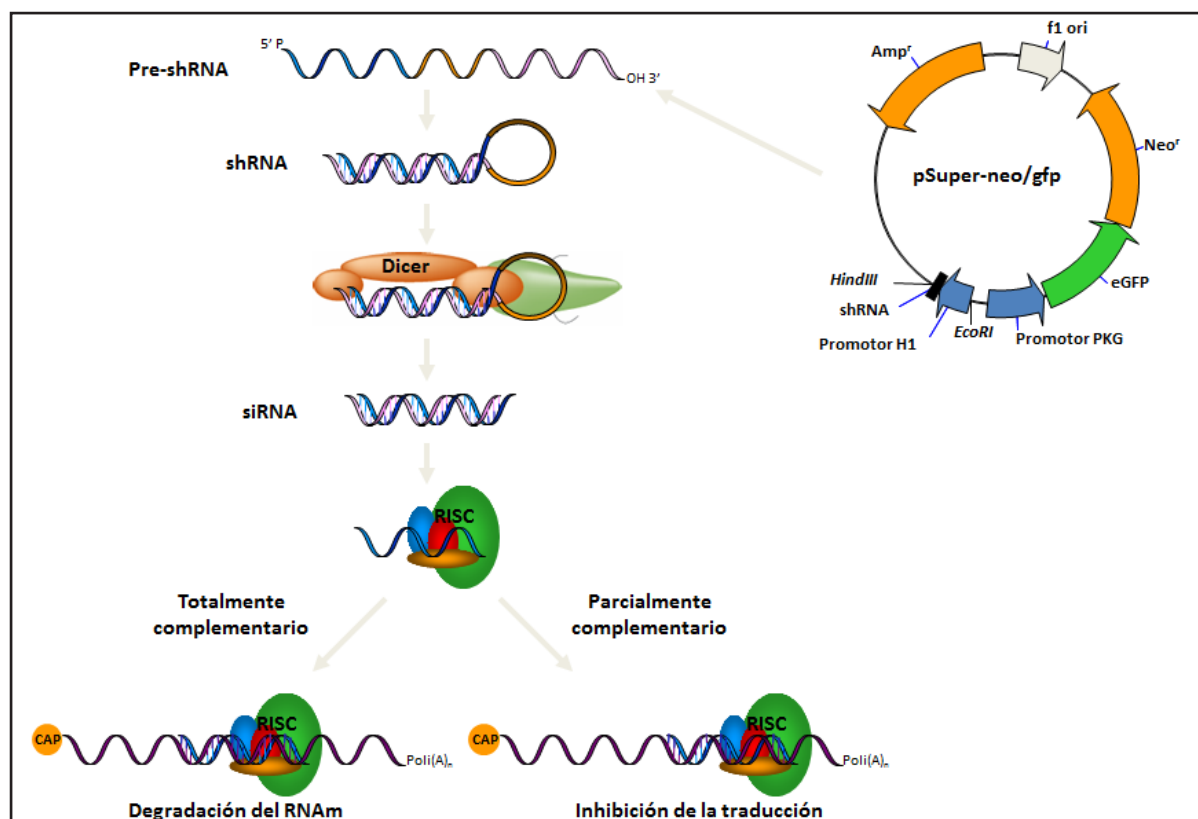


Figura 28. Mecanismo de acción de los shRNA.

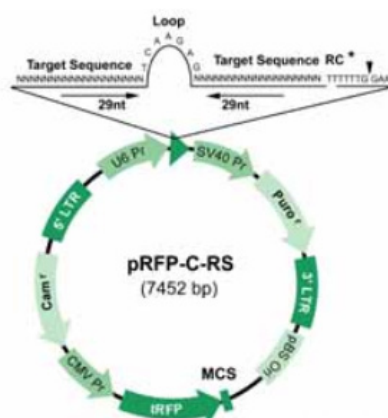


Figura 29. Vector modelo de los shRNA.

9. Transfecciones celulares.

Las transfecciones celulares se realizaron utilizando el reactivo catiónico Lipofectamina 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante. Este reactivo contiene unidades lipídicas que se agrupan formando liposomas en medios acuosos. Los liposomas cargados positivamente forman complejos con las cargas negativas de los ácidos nucleicos (tanto ARN como ADN) y los envuelven, de forma que la superficie de los liposomas queda cargada positivamente. Esto hace posible la fusión del liposoma con la membrana plasmática de las células vivas (cargada negativamente), permitiendo la entrada del nuevo material genético al interior celular y facilitando su acceso al núcleo durante la mitosis de la célula transfectada. Las células se sembraron al 80-90% de confluencia en pocillos tratados con poli-L-lisina y al día siguiente, antes de realizar la transfección, el medio se cambió por DMEM sin antibióticos. Para la transfección se preparó una mezcla de Lipofectamina y DMEM siguiendo las instrucciones del fabricante que se dejó incubando 5 min. A continuación esta mezcla se añade sobre el ADN diluido en DMEM y se dejó incubando durante 20 min antes de añadirlo a las células. A las 6 horas postransfección se cambió el medio de las células.

9.1. Transfección con los plásmidos reporteros de luciferasa.

Las células N2a o RAW 264.7 sembradas a una densidad de 100.000 células/cm² en pocillos pretratados con poli-L-lisina se cotransfectaron al día siguiente con 0,64 µg de cada uno de los plásmidos pGL4.23 que contienen los diferentes fragmentos del promotor y 0,16 µg de un plásmido que contiene el gen de la luciferasa de *Renilla* bajo el promotor débil de la timidina quinasa [hRLuc/TK] y que se utiliza como control interno de la transfección. Transcurridas 6 h se sustituyó el medio de transfección por medio de cultivo estándar para estas células. Las actividades luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* se midieron utilizando el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System*. Para ello, a las 24 o 48 h post-transfección se retiró el medio de cultivo y, tras realizar un lavado con PBS, se recogieron las células en 100 µl de tampón de lisis suministrado en el kit. Los lisados se congelaron y descongelaron dos veces para asegurar la completa ruptura de la membrana celular. A continuación, partimos de 20 µl de cada lisado celular en pocillos de placas de 96 pocillos de color blanco que se introdujeron en un lector de luminiscencia con inyectoros automáticos FLUOstar Optima. Para realizar las medidas de actividad luciferasa, a cada muestra se inyectaron 100 µl del tampón *Luciferase Assay Reagent II*, que permite cuantificar la actividad luciferasa de luciérnaga, y 100 µl del tampón *Stop&Glo*, con el que se midió la actividad luciferasa de *Renilla* (Figura 30).

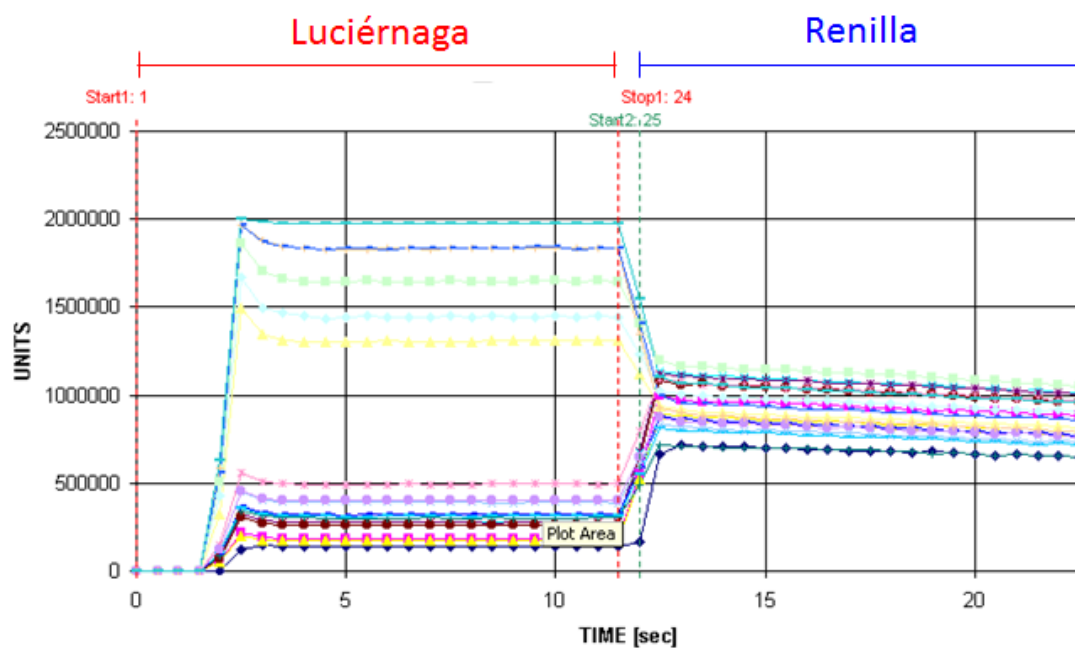


Figura 30. Registros de un experimento de análisis de la expresión de luciferasa. En la primera parte del ensayo se mide la expresión de luciferasa que induce el fragmento que se ha clonado, y en la segunda parte se mide la luciferasa de *Renilla*, que permite normalizar el resultado.

Estos ensayos se analizaron mediante el cálculo del cociente luciferasa de luciérnaga/luciferasa de *Renilla* y se normalizaron respecto al valor medio de luminiscencia registrado en las células control transfectadas con el vector pGL4.23 vacío.

9.2. Transfección con los plásmidos de sobreexpresión y silenciamiento de Sp1.

Las células N2a o los astrocitos corticales sembrados a una densidad de 100.000 células/cm² en pocillos pretratados con poli-L-lisina se cotransfectaron al día siguiente con 4 µg de los plásmidos de sobreexpresión o de interferencia. Transcurridas 6 h se substituyó el medio de transfección por medio de cultivo. A continuación, dependiendo del tipo de ensayo, las células se recogieron a distintos tiempos post-transfección. Para analizar el efecto de la sobreexpresión de Sp1 sobre la expresión de los plásmidos reporteros de luciferasa, las células se lisaron 48 h post-transfección. En los análisis realizados para analizar el efecto de la sobreexpresión o el silenciamiento de Sp1 en un contexto celular, las células se lisaron a las 48 h para analizar los niveles de ARNm y a las 72 h para estudiar los niveles de proteína.

10. Análisis estadístico de los datos.

Todos los datos obtenidos se expresan como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM). Los resultados mostrados en este trabajo corresponden a un mínimo de tres experimentos en duplicado realizados en cultivos independientes. Para los análisis estadísticos se ha utilizado el programa GraphPad Prism 5, aplicando un test de la *t* de Student cuando se comparan dos grupos de valores, o un análisis de la varianza *one way*-ANOVA. Los niveles de significación establecidos han sido: $P < 0,001$, diferencia extremadamente significativa (***) ; $P < 0,01$, diferencia significativa (**); $P < 0,05$, diferencia marginalmente significativa (*). Los niveles superiores a 0,05 se han tomado como no significativos. Para un análisis posterior a la obtención de un ANOVA inferior a 0,05, se utilizó el post-test de Newman-Keuls.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL NEUROBLASTOMA DE RATÓN NEURO-2a (N2a).

Como paso previo al estudio de la regulación transcripcional del receptor P2X7 en células neurales, tuvimos que seleccionar y caracterizar un modelo celular óptimo que cumpliera tres requisitos básicos: en primer lugar que la obtención, manipulación y mantenimiento de las células fuera lo más sencillo posible; en segundo lugar que presentara una alta eficiencia de transfección por métodos químicos como la lipofección, y en tercer lugar que expresara de forma endógena un receptor P2X7 funcional. Para cumplir los dos primeros requisitos se descartó el empleo de cultivos primarios, y nos decantamos por el empleo de una línea celular establecida. Respecto al tercer requisito, y puesto que buscábamos un modelo celular de origen neural, decidimos utilizar una línea de neuroblastoma ya que había estudios previos que demostraban que la mayoría de los neuroblastomas primarios analizados así como diversas líneas celulares de neuroblastomas humanos expresaban el receptor P2X7 (Ho et al., 2005; Raffaghello et al., 2006). Por estos motivos, finalmente nos decantamos el neuroblastoma de ratón Neuro-2 (N2a), un modelo ampliamente utilizado en el ámbito neurocientífico para el estudio de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Son células adherentes que en cultivo proliferan de manera continua exhibiendo una morfología tipo fibroblasto, mientras que en condiciones de bajo suero (0-2%) adquieren un fenotipo neuronal en el que desarrollan neuritas y expresan diversos marcadores neurales (Ruddle, 1969).

1.1. Expresión de receptores P2X en el neuroblastoma N2a.

Puesto que no existía ningún dato previo en el que se hubiera caracterizado la presencia de receptores P2X en esta línea de neuroblastoma, decidimos analizar si las subunidades P2X1 a P2X7 se expresaban en las células N2a en cultivo. En primer lugar se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR clásicos para obtener una idea cualitativa de la expresión de los receptores P2X, y como se observa en la figura 31A las células N2a parecen expresar en mayor o menor medida las 7 subunidades P2X clonadas hasta la fecha. Como control positivo se analizó en paralelo la expresión de estas subunidades en extractos de cerebro de ratón. Para determinar en términos cuantitativos la expresión de cada subunidad P2X se realizaron ensayos de Q-PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR) que mostraron una elevada expresión de las subunidades P2X1, P2X3, P2X4 y P2X7, siendo los transcritos correspondientes a las subunidades P2X1 y P2X4 los más abundantes. Por el contrario, la expresión de las subunidades P2X2, P2X5 y P2X6 fue muy reducida o prácticamente indetectable (figura 31B). Puesto que

frecuentemente la expresión de los ARNm no se corresponde con los niveles de la proteína correspondiente, se analizó por Western blot la presencia de los receptores P2X en extractos totales de proteína utilizando anticuerpos comerciales específicos para cada subunidad. Los tamaños teóricos calculados para las subunidades P2X no glicosiladas oscilan entre 43 y 68 kDa, mientras que los pesos moleculares de las formas glicosiladas se estiman entre 50 y 79 kDa (North, 2002). Como se muestra en la figura 32C, se observó una correlación aceptable entre la expresión de los transcritos obtenida y los niveles de proteína hallados para cada subunidad P2X. Así, se confirmó la presencia de las proteínas P2X1, P2X3, P2X4, P2X5 y P2X7, siendo las subunidades P2X3 y P2X7 las más abundantes. Las subunidades P2X2 y P2X6 no se detectaron por esta técnica. Los tamaños de banda obtenidos para las subunidades P2X1 (59 kDa), P2X3 (64 kDa), P2X5 (63 kDa) y P2X7 (78 kDa) se corresponde con los pesos moleculares de los monómeros glicosilados descritos por otros autores (Nicke et al., 1998; Roberts et al., 2006; Vulchanova et al., 1997). Las bandas de menor tamaño observadas para las subunidades P2X1 (48 kDa) y P2X4 (42 kDa) pueden corresponder a las formas no glicosiladas (Nicke et al., 1998; Soto et al., 1996). La banda de pequeño tamaño (45 kDa) correspondiente a la subunidad P2X7 podría corresponderse con un variante de procesamiento cuya existencia se ha descrito en humanos (Figura 31C) (Cheewatrakoolpong et al., 2005).

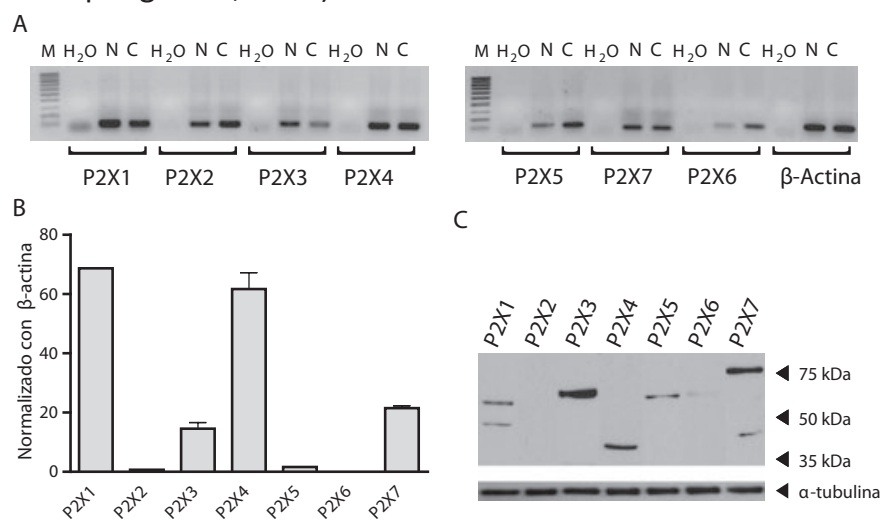


Figura 31. Diversos receptores P2X se expresan de manera simultánea en células de neuroblastoma murino N2a sin diferenciar. (A) Estudio de la expresión de receptores P2X por RT-PCR. Las bandas correspondientes a las subunidades P2X1-7 se localizan en torno a 100 pb y se amplificaron tanto de células N2a (N) como de extractos totales de cerebro de ratón (C). No se observó amplificación en los ensayos realizados sin ADN molde, que se tomaron como control de posibles contaminaciones (H₂O). M, marcador de peso molecular DirectLoad™ Wide Range. (B) Experimentos de Q-PCR que muestran el nivel de expresión de las subunidades P2X en células N2a. Todos los valores fueron normalizados frente a la expresión de β-actina. (C) Western blot de extractos de proteína total con anticuerpos específicos frente a cada una de las subunidades P2X. En estos experimentos se utilizó la α-tubulina como control de carga.

1.2. Caracterización funcional del receptor P2X7 en células N2a.

Una vez confirmado que las células N2a expresan la subunidad P2X7 tanto a nivel de ARNm como de proteína, quisimos comprobar si dichas subunidades conformaban un receptor P2X7 funcional. Para ello, se realizó una caracterización farmacológica en células individuales analizando los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} libre (abreviado $[\text{Ca}^{2+}]_i$) provocados por una variedad de agonistas purinérgicos, gracias al empleo de la sonda fluorescente de calcio Fura-2 AM. Los compuestos ensayados fueron los análogos del ATP, α,β -metilén-ATP (α,β -meATP) y 2',3'-O-(4-benzoil)-benzoil ATP (BzATP), CTP y el propio ATP. Como se observa en la figura 32A, el agonista de los receptores P2X1 y P2X3 α,β -meATP (100 μM) y el agonista del receptor P2X4 CTP (300 μM) no modificaron la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando se aplicaron en el medio de perfusión, mientras que el agonista del receptor P2X7 BzATP (100 μM) produjo un incremento moderado

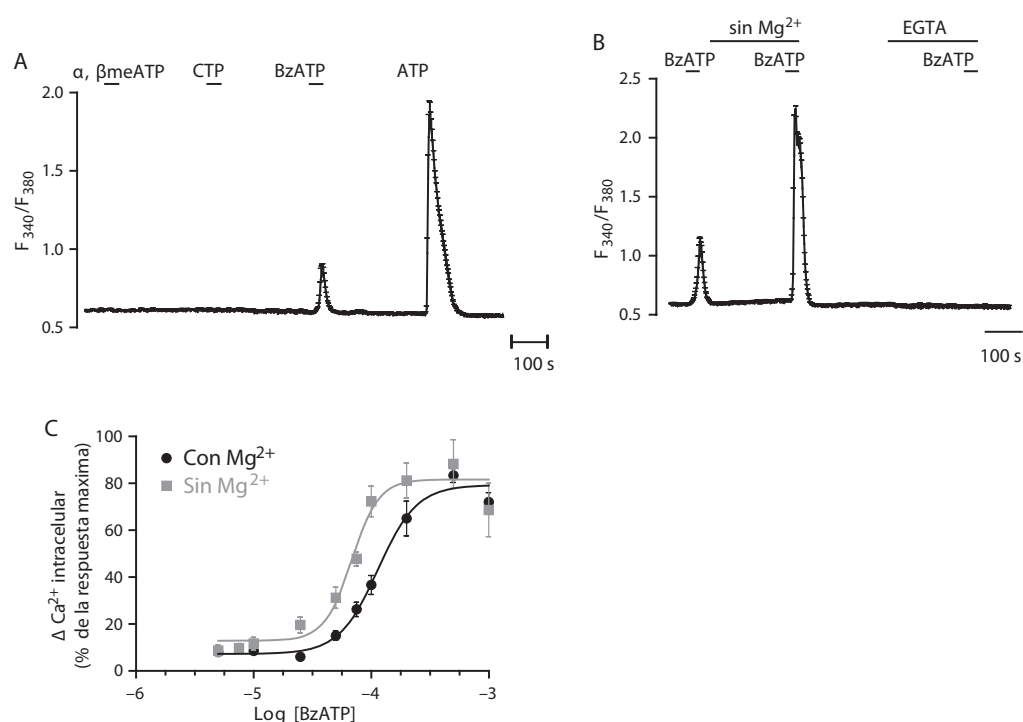


Figura 32. El BzATP induce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células N2a no diferenciadas que se potencia en ausencia de iones Mg^{2+} . (A) Incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por diferentes agonistas purinérgicos en células N2a. Las células fueron tratadas con concentraciones máximas de los agonistas α,β -meATP (100 μM), CTP (300 μM), BzATP (100 μM) y ATP (100 μM) durante el período indicado con las barras horizontales. El registro representa la media \pm SEM de 157 células. (B) Los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocados por BzATP (100 μM) en células N2a se potencian en ausencia de Mg^{2+} extracelular y requieren de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. Tanto la retirada de Mg^{2+} como el tratamiento con Tris/EGTA se llevaron a cabo 5 min antes y durante la aplicación del BzATP. El registro representa la media \pm SEM de 108 células. (C) Curvas de dosis-respuesta para el BzATP en células N2a en suspensión en presencia y ausencia de cationes Mg^{2+} . Las suspensiones celulares se estimularon con dosis crecientes de BzATP desde 5 μM hasta 1 mM preparadas en solución de Locke con o sin Mg^{2+} . Los resultados fueron normalizados respecto a la máxima respuesta generada por el BzATP. Los datos corresponden a la media \pm SEM de al menos cinco experimentos diferentes.

de la $[Ca^{2+}]_i$. Por último, el ATP (100 μ M) indujo un aumento significativo en la $[Ca^{2+}]_i$ que puede ser mediado tanto por la activación de receptores P2X como de receptores metabotrópicos P2Y, estos últimos previamente caracterizados en las células N2a (Lakshmi and Joshi, 2006).

Es característico del receptor P2X7 que la ausencia de cationes divalentes en el medio extracelular potencia las respuestas de calcio inducidas por la activación del dicho receptor (Surprenant et al., 1996; Virginio et al., 1997). Por este motivo, se analizó el efecto que ejercía la retirada del Mg^{2+} del medio de perfusión en las respuestas de calcio inducidas por el agonista BzATP. Como se muestra en la figura 32B, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por BzATP 100 μ M se duplicó en ausencia de Mg^{2+} . Para caracterizar en detalle la potenciación inducida por la retirada del Mg^{2+} , se obtuvieron curvas de dosis-respuesta en poblaciones de células N2a en suspensión en presencia o ausencia de Mg^{2+} en el medio extracelular, observándose valores de EC_{50} significativamente distintos: $114,02 \pm 9,55 \mu$ M en presencia de Mg^{2+} y $68,23 \pm 5,71 \mu$ M en ausencia del catión. Por el contrario, no se produjo una alteración significativa en el coeficiente de Hill, siendo de $2,62 \pm 0,59$ en presencia de Mg^{2+} y de $3,74 \pm 1,09$ en su ausencia (figura 32C). Cabe destacar que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por BzATP fue abolido en la mayor parte de las células analizadas cuando se perfundieron con una solución extracelular carente de Ca^{2+} , indicando la naturaleza mayoritariamente ionotrópica de la respuesta.

Para profundizar en la caracterización del receptor P2X7 se ensayó el efecto de tres antagonistas del receptor P2X7 sobre la respuesta de Ca^{2+} inducida por BzATP en ausencia de Mg^{2+} . Los tres compuestos utilizados, KN62, brilliant blue G (BBG) y A438079, no tienen efecto por sí solos sobre el receptor P2X7 pero sí son capaces de inhibir la respuesta de calcio inducida por el ATP o el BzATP sobre dicho receptor (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007; Jiang et al., 2000; Romagnoli et al., 2008). Los antagonistas se perfundieron 5 min antes y durante toda la aplicación del agonista BzATP 100 μ M. Como se aprecia en la figura 33, el KN62 (5 nM), el BBG (1 μ M) y el A438079 (1 μ M) inhibieron el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el BzATP en un $66,2 \pm 5,9\%$, $75,7 \pm 2,3\%$ y $71,7 \pm 13,0\%$, respectivamente. Curiosamente, el KN62 y el BBG se comportaron como antagonistas reversibles lentos, ya que la respuesta permaneció inhibida incluso 25-30 min después del lavado. Por el contrario, el efecto inhibitor del A438079 fue rápidamente eliminado tras 5 min de lavado. En conjunto, todos los resultados obtenidos indican que las células N2a expresan receptores P2X7 funcionales.

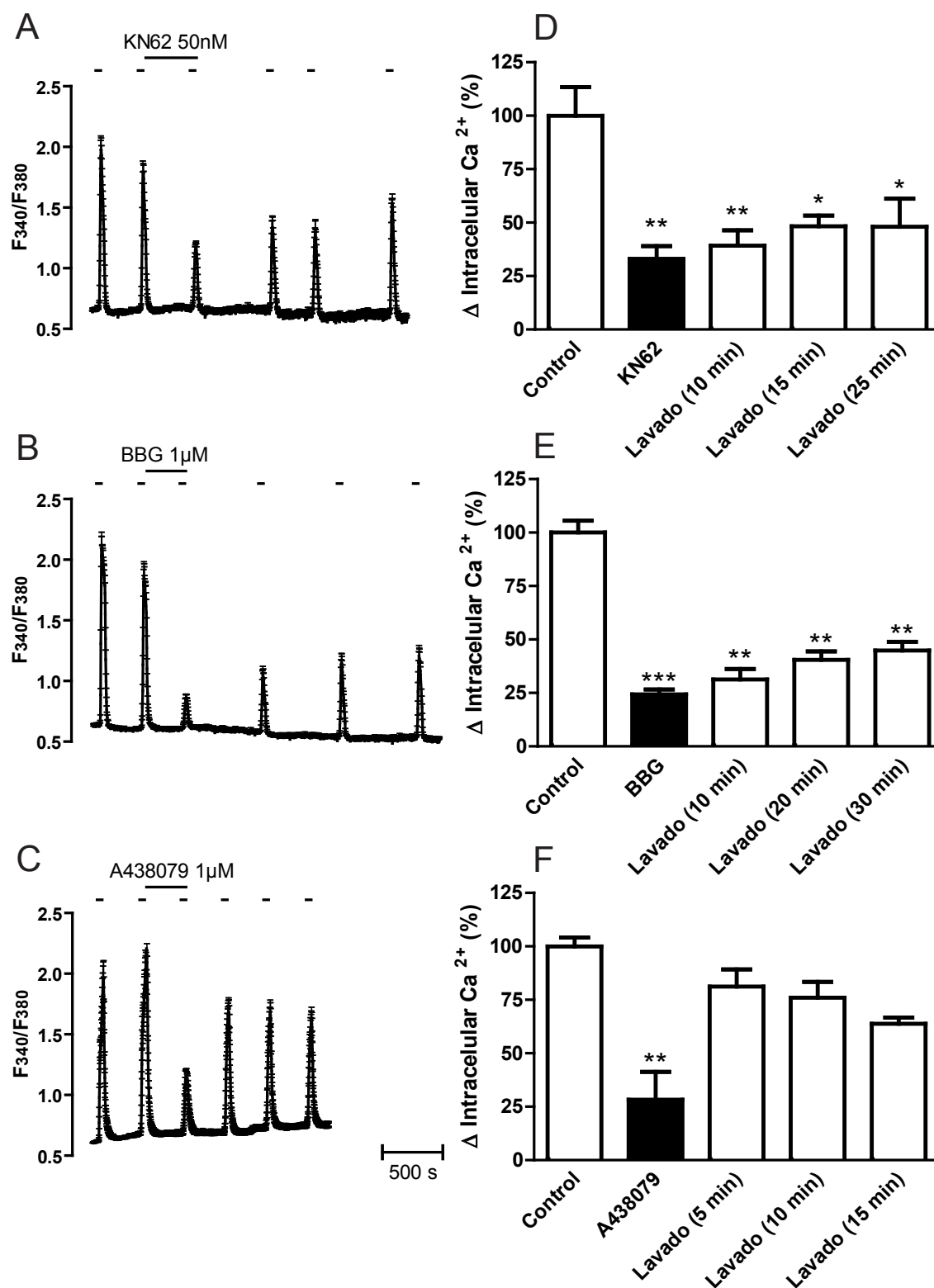


Figura 33. Los antagonistas del receptor P2X7 reducen la entrada de Ca^{2+} inducida por BzATP en células N2a no diferenciadas. Las células N2a fueron estimuladas dos veces con BzATP 100 μ M y a continuación se trataron con KN62 50nM (A), BBG 1 μ M (B) o A438079 1 μ M (C) durante 5 min antes y durante la aplicación de la tercera estimulación con BzATP. La recuperación de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por BzATP se evaluó durante 15-30 min de lavado, dependiendo del antagonista ensayado. Los registros representan la media \pm SEM de al menos 150 células. La inhibición de las respuestas inducidas por BzATP por KN62 (D), BBG (E) y A437980 (F) se expresan como el porcentaje de la media de los dos pulsos iniciales de BzATP (Control). La recuperación de la respuesta se evaluó en los tiempos indicados (Lavado). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (test t de Student).

2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL RECEPTOR P2X7.

Como se ha descrito anteriormente, el receptor purinérgico P2X7 está implicado en numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos en los que su nivel de expresión puede ser crucial, a día de hoy se conoce muy poco sobre la regulación transcripcional de este receptor (Burnstock et al., 2011). Estudios recientes muestran una expresión alterada, aumentada o disminuida, del receptor P2X7 en células tumorales (Di Virgilio et al., 2009; Feng et al., 2006; Greig et al., 2003; Li et al., 2007; Li et al., 2009; Li et al., 2006; Zhou et al., 2008), sugiriendo que sus niveles de expresión pueden estar relacionados con el desarrollo y/o evolución de determinados tipos de cáncer. Además, numerosos estudios indican que la alteración de la expresión y/o funcionamiento del receptor P2X7 juega un papel relevante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, alteraciones del estado de ánimo y en el dolor neuropático (Burnstock et al., 2011; Diaz-Hernandez et al., 2011; Diaz-Hernandez et al., 2009; Skaper et al.; Tsuda et al., 2010). Algunos estudios localizan una zona promotora activa del gen *P2RX7* humano en la región -158/+32 y existen evidencias de que la expresión del receptor P2X7 podría estar modulada negativamente por la hipermetilación de las islas CpG localizadas cerca del promotor activo (Buell et al., 1998; Zhou et al., 2009), sin embargo hasta la fecha no se ha podido identificar los factores de transcripción implicados en su regulación.

2.1. Análisis informático de la región promotora del gen *P2rx7*.

Con el fin de caracterizar la mínima región promotora necesaria para dirigir la expresión basal del gen *P2rx7* de ratón, y teniendo como referencia la secuencia génica disponible en GenBank™ (ID18439), se clonó un fragmento de 2334 pb correspondiente a la región 5'-flanqueante del gen *P2rx7* a partir de ADN genómico obtenido de células N2a. Este fragmento contiene la región -2114/+220 considerando +1 el sitio de inicio de la transcripción (TSS). La asignación del TSS se realizó mediante la alineación de las secuencias de los transcritos disponibles en GenBank™ correspondientes a las variantes de procesamiento alternativo 1, 2, 3 y 4 del gen *P2rx7* (nº de acceso: NM_011027, NM_001038845, NM_001038839 y NM_001038887, respectivamente). A continuación, se realizó un análisis informático del fragmento clonado utilizando el programa Genomatix MatInspector que localiza los teóricos sitios de unión de múltiples factores de transcripción. Este primer análisis “*in silico*” determinó que la región promotora del gen *P2rx7* carecía de cajas TATA o CAAT y contenía siete sitios putativos de unión para el factor de transcripción Sp1, todos ellos con una elevada

similitud con la matriz teórica de las cajas GC o GT ($>0,85$). Los sitios SP1 se localizaban tanto en la hebra sentido (posiciones -1457/-1441, -281/-265, -155/-139, -150/-134, y -79/-63) como en la hebra antisentido (posiciones -1/+16 y +131/+147). Curiosamente, la mayoría de estos sitios se localizaron en las proximidades del TSS, apuntando al factor Sp1 como un potencial regulador de la expresión del gen *P2rx7* (Figura 34A). Dado que los sitios SP1 colocalizan con frecuencia con islas CpG susceptibles de sufrir metilaciones que impiden la unión del factor Sp1 al ADN, se analizó con la ayuda del programa CpGPlot la región 5'-flanqueante del gen *P2rx7* en búsqueda de posibles islas CpG. Para realizar el análisis informático se fijaron dos parámetros básicos: las islas CpG deben contener un porcentaje de grupos CG superior al 50% y el cociente entre la frecuencia de grupos CG observados y esperados debe ser mayor de 0.6. El análisis bioinformático reveló que el promotor del gen *P2rx7* carece de islas CpG, descartando así que la metilación de los sitios SP1 presentes en la región promotora pueda interferir en la interacción de Sp1 con sus sitios de unión en el ADN (Figura 34B). Adicionalmente a los sitios Sp1, el programa Genomatix MatInspector identificó en la región 5'-flanqueante del gen *P2rx7* la existencia de putativos sitios de unión para otros factores de transcripción como AP1 (proteína activadora 1), CREB (proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico), c-Jun, HIF (factor inducible por hipoxia), STAT (transductor de señal y activador de la transcripción), TCF/LEF1 (sitios implicados en la vía de señalización de Wnt) y YY1 (activador/represor de la unión al sitio de inicio de la transcripción).

2.2. Análisis funcional de la región promotora del gen *P2rx7*.

Basándonos en la información proporcionada por el programa Genomatix MatInspector, se analizó la actividad transcripcional del promotor del gen *P2rx7* generando una serie de fragmentos obtenidos mediante deleciones en el extremo 5' o 3' de la región -2114/+220 clonada. Cada fragmento se amplificó por PCR y se clonó en el vector pGL4.23 que contiene un promotor mínimo (caja TATA) y el gen de la luciferasa de luciérnaga precedido por un sitio de clonaje múltiple. En la figura 35A se muestra un esquema de los fragmentos clonados donde los números indican la posición relativa al TSS (+1). Las construcciones obtenidas que contenían los distintos fragmentos del promotor *P2rx7* se cotransfectaron en células N2a junto con el vector pGL7.74[hRluc/TK]. Este vector contiene el gen de la luciferasa de *Renilla* bajo el promotor de la timidina quinasa y se utilizó como control de la eficiencia de transfección. Transcurridas 24 h postransfección se evaluó la actividad de cada fragmento midiendo la actividad luciferasa con el kit *Dual-Luciferasa Reporter Assay System* (detallado en Métodos).

5' - AGGTTTGGAATAAT - 3'

YY1F TCF/LEF1

-2100 GGCAGCTAGCCCTCTAGTTCTACCCACTAGCTTTTACTGCTCTAATGGAAGCCCTTTGGCCATCATTTGTGTACATTCATCTTTGGTGTGTGTGTGTGTG

-2000 TGTGTGTGAGCTTGCGTGACCACCTGTGCATATTTGTGCACAGTTTTAATGGAGTCAGTTCTCTCCAAGTATTCGGGTCTGGGACCGGAACCTCAGGTCT

CREB

-1900 ATCAGGCTTGATGSCACCTTCGTCTATCTCACTGTCCTCCATTATTGAAGGTACTGTACTCCTCCGAGTTTGAAGAGGATAGTGACAAAGGTACAGGCAG

-1800 AGTTAAGAGAAAGCGGTAAAGAGTGTCTGGCTAGGGGCTGGCGAGATGGCTCAGTGGTTAAGAGCGCCGTCTGCTTTTCCAAGGTCCCGAGTTCAAATC

E-box

-1700 CGAGCAACCCATGCTGCTCACAACCTACCGTAACGAGATCTGATGCCCTCTCTCGGAGTATCTGAGGACAGCTATAGTGTACTTACATATAATAATAAT

-1600 AATAAATGTTCAAAAAAAAAAAGTGTGCTGGCTAGAGAGGGCTACAGAGGGAAGCCCTTACCCCTCCGGGGCTCCCGAGTAACAGAGAGGGTTGGGAG

SP1

-1500 ACGCATCTAGCATCACTGCTTCTAGTCCCTTGAAGCTGGAGCAACAGGGGACAGGGCTTGATGTAGATCATAAAGGAGGAAAGATCAAAATTAAGTTA

-1400 GGCTGGAACATGTAAAGTCTGCCCTGGCCATAATGCAGCAGGCAAGACAGCAGTAGGTTGGGATGCTTGGGGGAGATGTTCTTTCTCCCTAGGGAGGG

STAT STAT HIFF

-1300 ATAACGCTGAGTGACTGTTGCTTCTTCTCTAAAGCTCTAACATCTCACTTGTGCTGGAAGTTTCAGGTCTCAGCAAGCAGCAGCATAGCCAGT

TAGGACA

-1200 TAGGACASAGCCTCAGACACCAAGGCTCTGAGGTGGCTCATTGTAGGACATCGGGTCTTTATCACCCAGGACCAAGCATCCACTGTGTAAACCGTGTGG

-1100 GAAAGGCTGCTTTATACATCTGCTTCTCTACAGCCTGTCCGAGCAGGGTTTACAGCCCTGGTGTGGTCCCTCGCAACATATAGTCCCAGAAATTTGTAGC

AP1

-1000 TGGAGGTGTGGGAAAGATGAAGGCTTAAGGTCAGTCTCAGCCTCAGAGTAAGTTACAGAGAACTCTGAGTTACACBSAGACCCTGTCTCAAAACAAAAAT

STAT

-900 AATAGAGAATAAAACAACAAACCGCACAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCAACCAACAAAGATTTCTCTCAACTCCACTTCCCTCA

TCF/LEF1

-800 GAATTCCTCAATGAGGCTACCTCTTCTACTATTGGAGATAGCATTTGGTCTCTCTCATGAGGTGTCTCCATGGTCAGGAGGATACGTGAATGACGTTT

GTCTCTGTG

-700 GTCTCTGTGTTGGTCTAGGACTGACTGGACCATGAGATGACCTCCCGGGTCCCGAGCAGGATGAAGTGTAGATGGAAGGAGAGAGTGAGACAAAGCTGGATAT

YY1F YY1F

-600 AATCTTCCCATCCCAATGAATCTGATCTGCGAGCCATCTTTGGCAGACAGAGATACCCGTGGAGCAGCGGAGGACCAATGATGCCATTTCAGTCATCGG

TCF/LEF1 TCF/LEF1

-500 GTGCACCTGTACATGTGCTACTGAACAAAGGGTGTCTCGGAAACAAAGGGATATCTCTGTGGGGTGCGGTGGGGCTCACCTATAATCCAGCACTCGGG

AP1 AP1

-400 AGGTGGAGGCAGGAGGATCAGAAGTTTCATAGCTAGCTTCTGAGTGAGTACAAATCTAAGGTCAGCCTGCTGCTTGAAGACAGGTCTCAACAGGCAACA

SP1 AP1

-300 AAAGAAATGGATGGGTCTGCTGGGGGTGGGGGGCTGAGGCGAGTGGTGCATCTAGGCCCTTCTGAGTCACTCTGAGTCACTCTTGAAGGA

CTGCCCTTTTCTCTCAAAATGAATGAGTTCCAAAAGAGCAACAGG

SP1 SP1 YY1F

-200 CTGCCCTTTTCTCTCAAAATGAATGAGTTCCAAAAGAGCAACAGGAAAGGGGTGGGGAGGGGAATTTTAAATATGCCCATCTCTGAACACCATCTTT

SP1

-100 GTGCGGGCGCTGGGGGAGGCTAGCGGGGCGGGGTCATCTGCCAGCCAGGCGCTGTAGGACTTGGTCTTGTGTTTATTCCTACTCACATTAGGGCAGTGTGCT

SP1

+1 AGGACCCGCCCCCGCTGCAGTCACTGGAGGAATGGAAGTTAAGCGTTCTGCTGAGAAATCGGTGTGTTTCTTCTTGGCTGCTCTAGGTGAGGGTTTGC

SP1

+100 TGTGGTCTAGCCTGGGAAGTAGGTCATAGCTCAAGTCCAGCCTGAACAGGAGCAGCTGTGCCATGCCGGCTTGTCTGCAGCTGGAACGATGTCTTGCAGT

TCF/LEF1

+200 ATGAGACAAACAAAGTCACG-3'

Figure 1 consists of two vertically stacked line plots sharing a common x-axis representing genomic coordinates from -2114 to +220. The top plot displays 'Percentage GC' on the y-axis, ranging from 0 to 100. A solid line represents the GC content, which fluctuates around a dashed horizontal line at 50%. The bottom plot displays the 'Obs/Exp' ratio on the y-axis, ranging from 0.0 to 1.5. A solid line represents this ratio, fluctuating around a dashed horizontal line at 0.6. Below the x-axis of the bottom plot, there is a track of vertical bars representing 'Dinucleotide GC' content. The x-axis has major ticks at -2114, +1, and +220.

Como se muestra en la figura 35B, el plásmido de mayor tamaño pP2X7-A mostró una actividad luciferasa superior a la del vector vacío ($1,53 \pm 0,12$), mientras que el plásmido pP2X7-B exhibió una actividad aún más elevada ($2,04 \pm 0,33$). Los plásmidos con mayor actividad luciferasa fueron pP2X7-C ($3,45 \pm 0,26$), pP2X7-D ($2,97 \pm 0,19$) y pP2X7-F ($2,98 \pm 0,24$). Curiosamente en el plásmido pP2X7-E, que contiene una delección en 3' de 522 bp respecto al fragmento D, se redujo drásticamente la actividad luciferasa ($0,87 \pm 0,09$). Del mismo modo, la delección en 5' de 266 pb del fragmento F para generar el plásmido pP2X7-G mostró una actividad luciferasa similar a la del vector vacío ($0,97 \pm 0,09$). Analizando detenidamente estos resultados podemos concluir que la región situada entre las posiciones -249 y +17 debe contener elementos esenciales para la regulación de la transcripción basal del gen *P2rx7*.

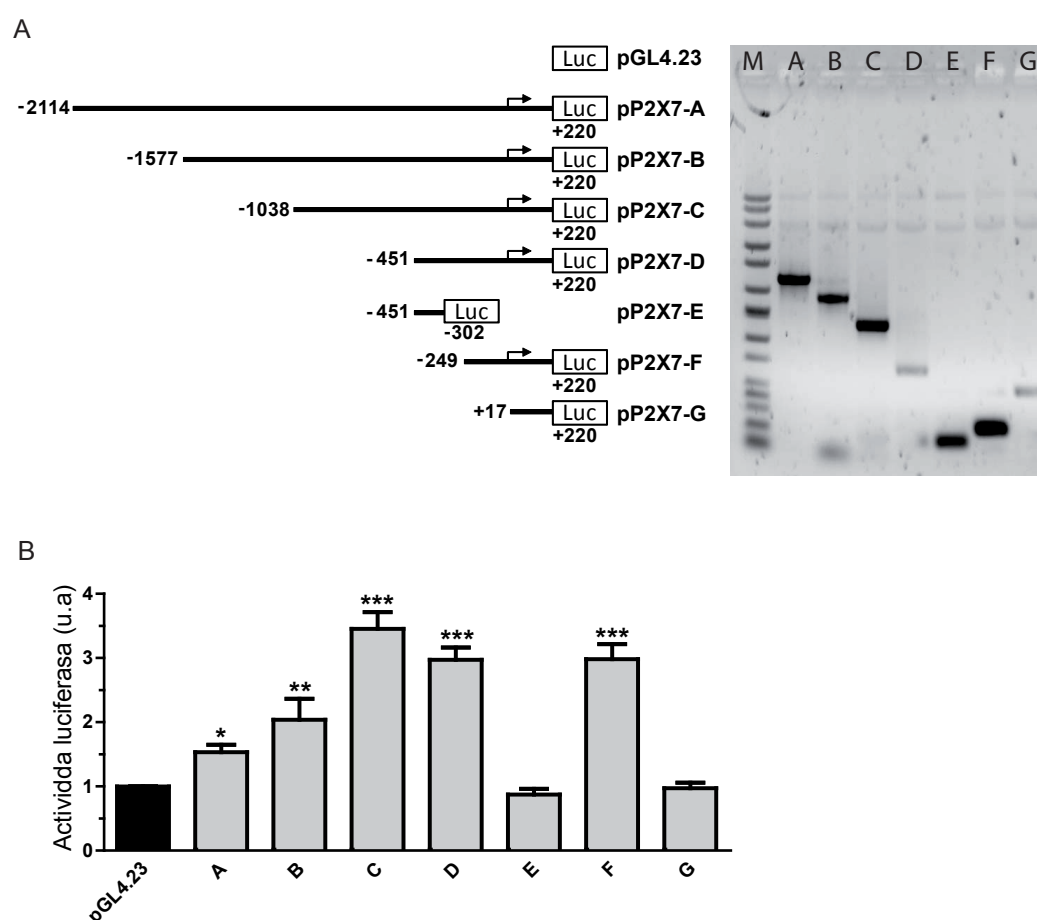


Figura 35. Estudio del promotor del gen *P2rx7* de ratón mediante análisis de delección. (A) Diagrama esquemático y análisis en gel de agarosa de los fragmentos de la región 5' flanqueante del gen *P2rx7* analizados. Se han realizados sucesivas delecciones para crear fragmentos de tamaño decreciente que se han clonado en el vector reportero de luciferasa de luciérnaga pGL4.23. Las flechas indican el sentido de la transcripción y los números indican la posición de los fragmentos relativa al TSS. (B) Los plásmidos construidos se cotransfectaron en células N2a con el vector de luciferasa de *Renilla* pGL4.74[hRluc/TK] empleado como control de eficiencia de transfección. 24 h postransfección se recogieron las células y se midió la actividad luciferasa de luciérnaga, normalizándola con la actividad luciferasa de *Renilla*. Los valores representan la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes en triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA con post-test Newman-Keuls).

2.3. Presencia de sitios SP1 en la región 5' proximal del gen *P2rx7*.

Como se ha indicado anteriormente, el programa Genomatix MatInspector mostró que la región de 2334 pb situada en el extremo 5' del gen *P2rx7* contenía siete sitios teóricos de unión para el factor Sp1. Curiosamente, cuatro de los siete sitios SP1 se localizaron dentro de la región situada entre las posiciones -249 y +17. Con el fin de delimitar al máximo esta región promotora y analizar la implicación de los cuatro sitios SP1 contenido en ella, el fragmento F se dividió en tres subfragmentos F1, F2 y F3 que se clonaron en el vector pGL4.23 (Figura 36A). El primer fragmento F1 (-249 a -139 pb) contiene dos sitios SP1 (denominados a partir de ahora SP1a

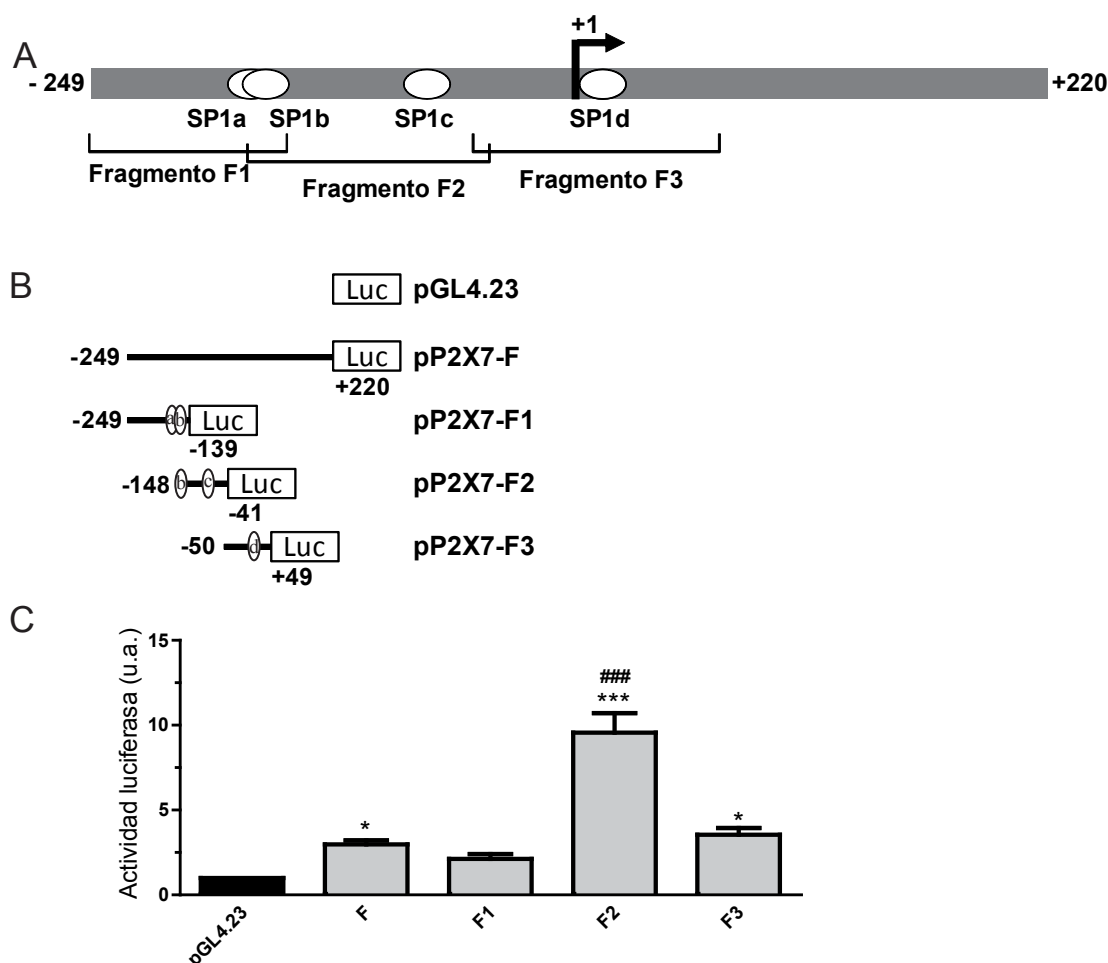


Figura 36. Análisis funcional de los putativos sitios SP1 presentes en el promotor del gen *P2rx7*. (A) Representación esquemática del fragmento F (-249 a +220) que contiene cuatro sitios SP1 próximos al TSS. El fragmento F se dividió en tres fragmentos de menor tamaño F1 (-249 a -139), F2 (-148 a -41) y F3 (-50 a +49), como se indica. (B) Los fragmentos de delección se obtuvieron por PCR y se clonaron en el vector reportero de luciferasa pGL4.23. Los números representan las posiciones de los fragmentos relativos al TSS y las elipses blancas señalan la localización de los sitios SP1. (C) Los plásmidos construidos se cotransfectaron en células N2a con pGL4.74[hRluc/TK] como control de la eficiencia de la transfección. 24 h postransfección se midió la actividad luciferasa normalizada frente a la actividad luciferasa de *Renilla*. Los valores representan la media \pm error estándar de la media de al menos tres experimentos independientes en triplicado. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs vector vacío; ### $P < 0.001$ vs fragmento F (ANOVA con post-test Newman-Keuls).

y SP1b), el segundo fragmento F2 (-148 a -41 pb) incluye el sitio SP1b y otro sitio SP1 (denominado SP1c), y el tercer fragmento F3 (-50 a +49 pb) contiene el TSS y el último sitio SP1 (denominado SP1d) (Figura 36B). Al analizar la actividad luciferasa de los plásmidos que contienen los fragmentos F1, F2 y F3 se observó que pP2X7-F1 exhibía una actividad luciferasa muy reducida ($2,13 \pm 0,27$) comparada con el plásmido pP2X7-F2 que presentó una actividad luciferasa casi 10 veces superior ($9,56 \pm 1,16$) a la del plásmido vacío. Por último, el plásmido pP2X7-F3 mostró una actividad similar a la del fragmento F completo ($3,55 \pm 0,39$ *versus* $2,98 \pm 0,24$, respectivamente) (Figura 36C). Estos resultados sugieren que el sitio SP1c, sólo contenido en el fragmento F2, puede desempeñar un papel importante en la regulación de la transcripción del gen *P2rx7* mediada por Sp1. Dado que Sp1 es capaz de mediar una acción sinérgica en los promotores que contienen múltiples cajas GC que se lleva a cabo gracias a la función de una pequeña región situada en el extremo del dominio C-terminal (Suske, 1999), decidimos analizar si un fragmento que contuviera los sitios SP1b, SP1c y SP1d induciría una mayor actividad luciferasa que la observada con los fragmentos F2 y F3. Para ello se

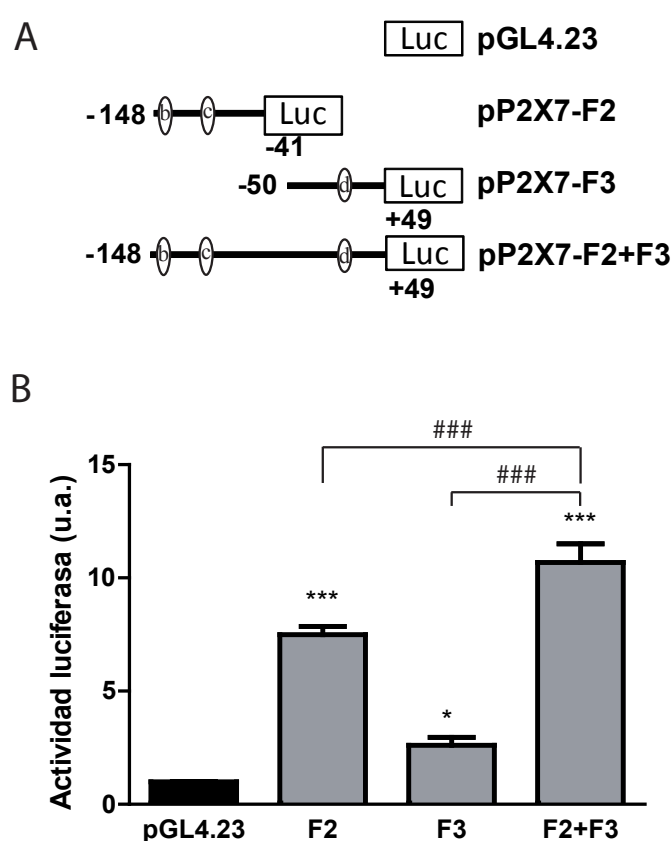


Figura 37. (A) Representación esquemática de los fragmentos que contienen sitios Sp1. (B) Actividad luciferasa inducida por los fragmentos F2, F3 y la suma de ambos F2+F3. Los valores representan la media \pm error estándar de la media de al menos tres experimentos independientes en triplicado. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

construyó un nuevo plásmido denominado pP2X7-F2+F3 (-148 a +49 pb) conteniendo los sitios SP1b, SP1c y SP1d. Como puede verse en la figura 37, la actividad luciferasa inducida por el plásmido pP2X7-F2+F3 se incrementó significativamente respecto a la mediada por los plásmidos pP2X7-F2 o pP2X7-F3 por separado, indicando una acción sumatoria de los sitios SP1 presentes en la región 5' proximal del gen *P2rx7* que es capaz de inducir una actividad promotora aún más potente.

2.4. Análisis filogenético de los sitios SP1.

Con el fin de evaluar la importancia relativa de cada uno de los sitios SP1 contenidos en la región -249/+17 se realizó un análisis filogenético de dicha región mediante el alineamiento de secuencias homólogas pertenecientes a distintas especies de mamífero (ratón, rata, macaco, orangután, chimpancé y humano). Como se muestra en la figura 38, los sitios SP1a y SP1b permanecen conservados en ratón, rata y macaco, pero desaparecen en orangután, chimpancé y humano. Por el contrario, los sitios SP1c y SP1d mantienen un alto grado de homología entre todas las especies analizadas, tanto en su secuencia de nucleótidos como en su distancia relativa. Concretamente el sitio SP1c se conserva intacto en ratón, rata, macaco y orangután. Además, aunque en chimpancé y humano se produce el cambio de un nucleótido C por T dentro del sitio SP1c que transforma una caja GC en una caja GT, ésta se comporta igualmente como un sitio de unión para Sp1 (Suske, 1999; Suske et al., 2005). Respecto al sitio SP1d, que está localizado muy cerca del TSS, se encuentra conservado en todas las especies

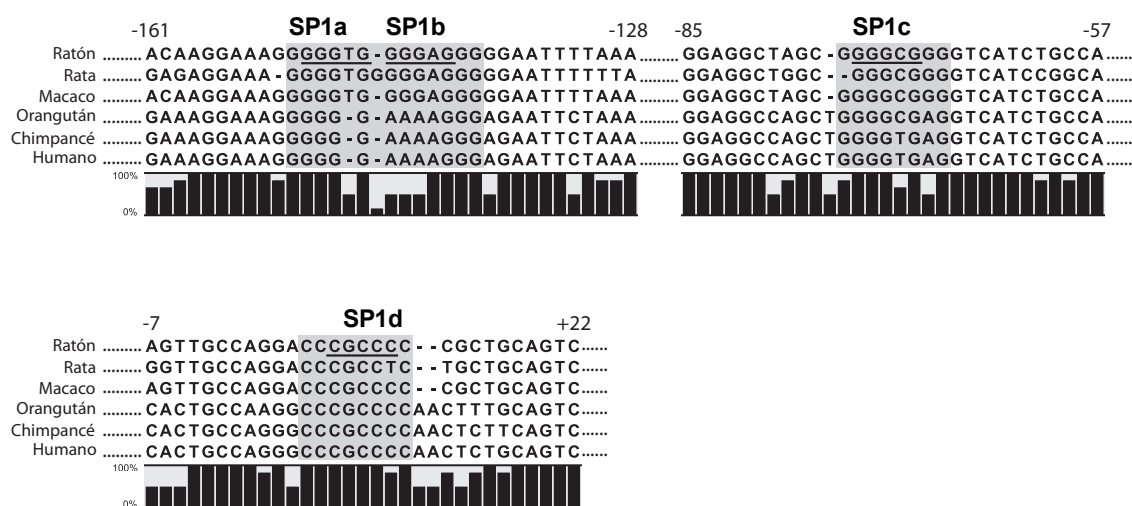


Figura 38. Alineamiento de secuencia de los sitios SP1 localizados en la región promotora proximal del gen *P2rx7* en diferentes especies de mamífero. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos de NCBI-GenBank y Ensembl. Los números se refieren a la secuencia de ratón desde la posición -161 a +22 pb. El alineamiento de los putativos sitios de regulación aparece con fondo gris. El diagrama negro de la parte inferior indica el porcentaje de conservación de los sitios Sp1 respecto a la secuencia de ratón. Las putativas regiones implicadas directamente en el reconocimiento y unión de Sp1 aparecen subrayadas.

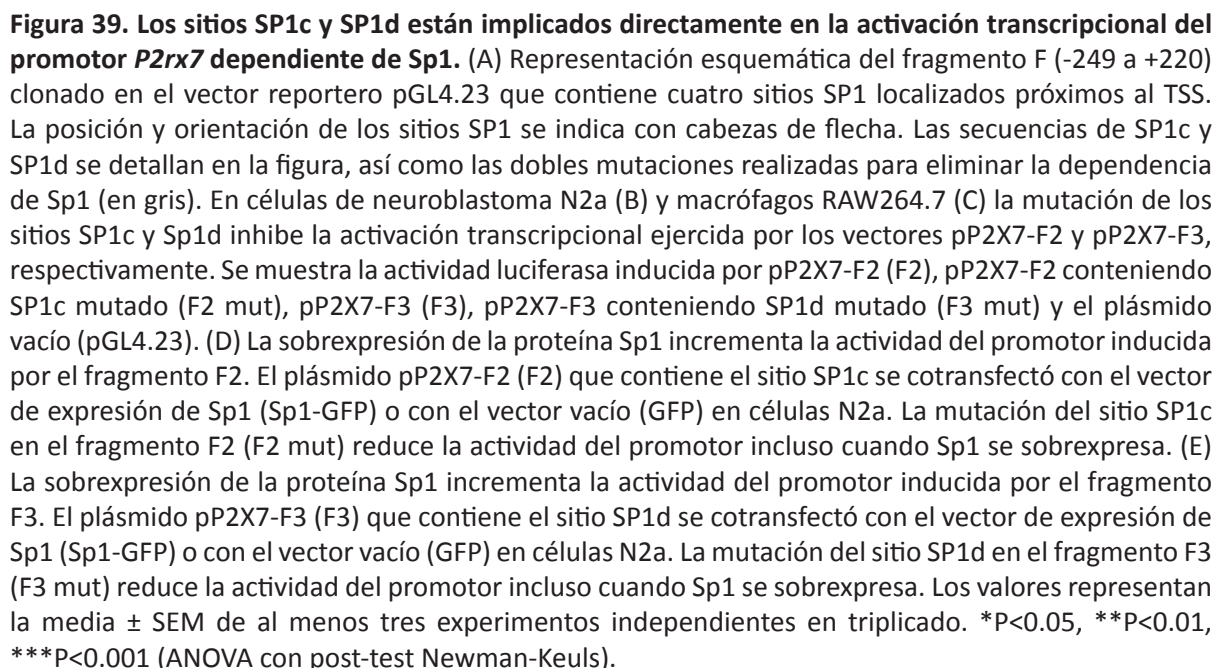
analizadas. Estos resultados sugieren que los sitios SP1c y SP1d pueden desempeñar un papel importante en la regulación transcripcional de la expresión del receptor P2X7 en mamíferos.

2.5. Análisis funcional de los sitios SP1.

Para comprobar la funcionalidad de los sitios SP1c y SP1d se realizaron mutaciones puntuales en los plásmidos pP2X7-F2 y pP2X7-F3 dirigidas contra dos de los nucleótidos clave dentro de la secuencia consenso de los sitios SP1 contenidos en el promotor *P2rx7* (Figura 39A). A continuación realizaron estudios de actividad luciferasa en células N2a comparando la capacidad promotora de los plásmidos pP2X7-F2 y pP2X7-F3 con la de las nuevas construcciones mutadas pP2X7-F2mut y pP2X7-F3mut. Como se muestra en la figura 39B, la mutación de los sitios SP1c y SP1d bloqueó por completo la inducción de actividad luciferasa observada en los plásmidos originales, indicando que ambos sitios SP1 están regulan la transcripción del gen *P2rx7*.

Para analizar si la regulación transcripcional del receptor P2X7 mediada por Sp1 es exclusiva de células de origen neural o si, por el contrario, se trata de una regulación generalizada independientemente del tipo celular, se realizó un ensayo similar al anteriormente descrito en macrófagos en los que se ha caracterizado ampliamente la expresión nativa del receptor P2X7 (Wewers and Sarkar, 2009). Para ello se transfectó la línea de macrófagos RAW264.7 con los plásmidos pP2X7-F2, pP2X7-F3, pP2X7-F2mut y pP2X7-F3mut y se realizaron ensayos de actividad luciferasa. En el caso de los macrófagos, tanto el fragmento F2 como el F3 mostraron una capacidad promotora muy similar, induciendo unos incrementos de actividad de $16,34 \pm 1,50$ y $19,54 \pm 1,63$, respectivamente (Figura 39C). Como era de esperar, la mutación de los sitios SP1c y SP1d bloqueó por completo la actividad luciferasa inducida por las construcciones no mutadas. Estos resultados indican que la regulación transcripcional que Sp1 ejerce sobre el gen *P2rx7* no se encuentra restringida a un determina tejido o tipo celular.

Finalmente, quisimos confirmar la funcionalidad de los sitios SP1c y SP1d utilizando un vector de expresión de la proteína Sp1 de ratón que también expresaba GFP (Sp1-GFP). Para ello, las células N2a se cotransfectaron con el plásmido Sp1-GFP o el vector vacío (GFP) y con las construcciones pP2X7-F2 o pP2X7-F3, analizando la actividad luciferasa a las 48 h postransfección. Como se muestra en la figura 39D, la actividad luciferasa inducida por el fragmento F2 se ve duplicada cuando se sobreexpresa la proteína Sp1, y esta potenciación se reduce considerablemente cuando se muta el sitio SP1c. Cabe destacar que la mutación de SP1c no fue capaz



de bloquear por completo el incremento en la actividad del fragmento F2 inducido por la sobreexpresión de Sp1, probablemente porque contiene el sitio SP1b en su versión *wild type* (Figura 36B). La sobreexpresión de Sp1 también duplicar la actividad transcripcional del plásmido pP2X7-F3 (Figura 39E), aunque en este caso el efecto de la sobreexpresión fue completamente abolido por la mutación del sitio SP1d. En conjunto, todos los datos obtenidos por el momento confirman claramente que el factor de transcripción Sp1 regula positivamente la expresión del gen *P2rx7* mediante su unión a los sitios SP1 localizados en la región promotora proximal de dicho gen.

2.6. Efecto de la sobreexpresión de Sp1 en la expresión del receptor P2X7 nativo.

Es fundamental considerar que los resultados obtenidos en los ensayos de actividad luciferasa se obtienen a partir del plásmidos en los que los fragmentos correspondientes al promotor *P2rx7* no presentan una estructura empaquetada como lo está realmente la cromatina de las células eucariotas. En consecuencia, el acceso de los factores de transcripción no se ve obstaculizado en este tipo de ensayos y pueden darnos informaciones relativamente imprecisas. Por este motivo, siempre es necesario analizar la función del promotor en un contexto nativo, cuando el ADN se encuentra compactado y la accesibilidad de las proteínas reguladoras puede verse

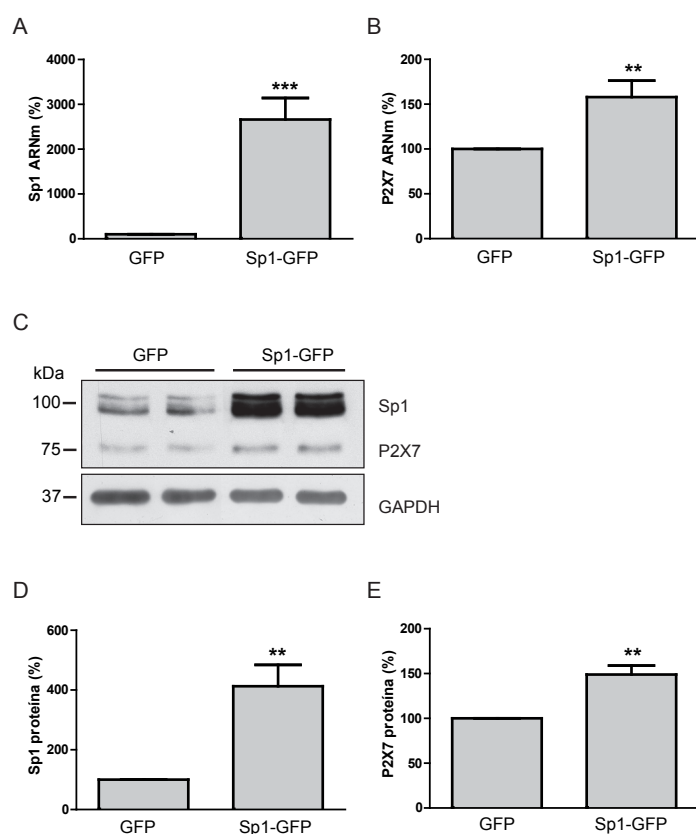


Figura 40. La sobreexpresión de Sp1 favorece la expresión del receptor P2X7 endógeno. Se transfectaron las células N2a con el plásmido de expresión de Sp1 (Sp1-GFP) o el plásmido vacío (GFP) y se analizaron 48 h después los niveles de ARNm de Sp1 (A) y P2X7 (B). Se realizó una electroforesis en gel de poliácridamida de los lisados celulares para analizar los lisados celulares de células N2a transfectadas con pSp1-GFP y pGFP. Se detectaron ambas proteínas, Sp1 a un tamaño de 95-105 kDa y P2X7 a 75 kDa. Como control interno de carga se utilizó la GAPDH. Se llevaron a cabo análisis densitométricos usando el programa Image J (D, E). Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (test t de Student).

comprometida. Siguiendo este razonamiento, las células N2a se transfectaron con el vector de expresión Sp1-GFP o con el plásmido vacío GFP y se analizaron los niveles de expresión del receptor P2X7 endógeno, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Los estudios de Q-PCR revelaron que a las 48 h postransfección, la sobreexpresión de Sp1 produjo un aumento significativo en el transcrito del receptor P2X7 (Figura 40A-B). Del mismo modo, los análisis por Western blot demostraron que a las 72 h postransfección la sobreexpresión de Sp1 es capaz de aumentar significativamente los niveles de dicho receptor (Figura 40C-E), indicando que efectivamente Sp1 es capaz de inducir la expresión del receptor P2X7 nativo en células N2a.

2.7. Efecto del silenciamiento de Sp1 en la expresión del receptor P2X7 nativo.

El siguiente paso lógico tras observar el efecto de la sobreexpresión de Sp1 era analizar el efecto de su silenciamiento. Para ello las células N2a se transfectaron con vectores de interferencia o “*small hairpin RNA*” (shRNA) específicos para reducir la expresión del factor Sp1 endógeno y ver el efecto que esta reducción tenía en la expresión del receptor P2X7 nativo. Se ensayaron dos shRNA diferentes, utilizando como control de transfección un vector de interferencia no relacionado o “*scrambled*”,

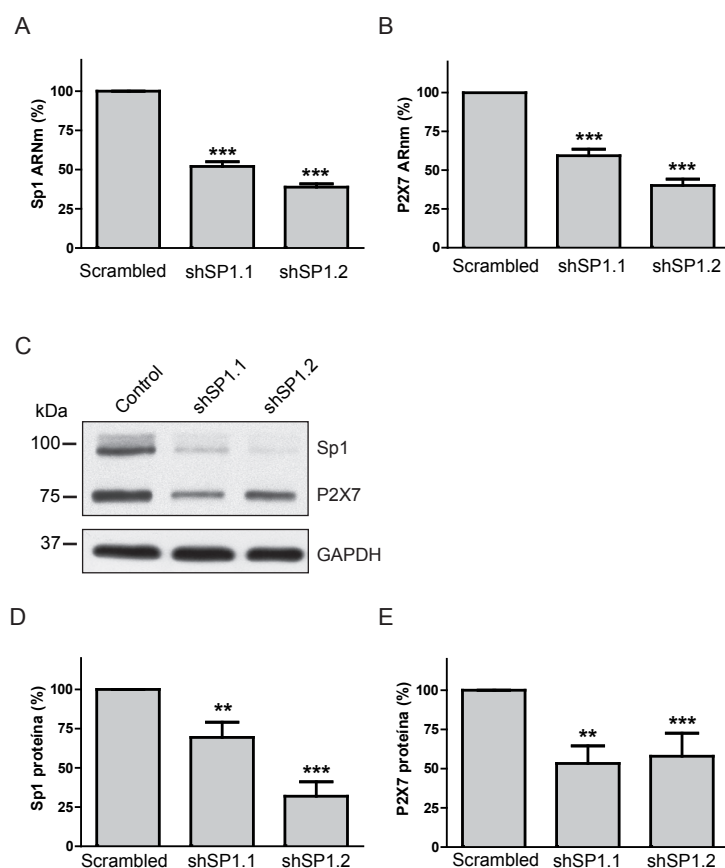


Figura 41. El silenciamiento de Sp1 reduce la expresión del receptor P2X7 endógeno. Se utilizaron dos ARN de interferencia específicos (shSP1.1 y shSP1.2) para reducir la expresión de Sp1 en células N2a. 48 h postransfección se analizó la cantidad de ARNm de Sp1 (A) y P2X7 (B) por Q-PCR. Como control negativo se utilizó un ARN de interferencia no relacionado o “scrambled”. (C) El silenciamiento de Sp1 redujo la expresión de ambas proteínas Sp1 y P2X7. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para analizar los lisados de proteínas totales de células N2a transfectadas con shSP1.1, shSP1.2 o el “scrambled” durante 72 h. Como control interno de carga se utilizó GAPDH. Se llevaron a cabo análisis densitométricos usando el programa Image J (D, E). Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado. **P<0.01, ***P<0.001 (test t de Student).

y se analizaron los niveles de ARNm y de proteína del receptor P2X7 a 48 y 72 h postransfección, respectivamente. Como se aprecia en la figura 41A, los dos vectores de interferencia ensayados (shSP1.1 y shSP1.2) redujeron significativamente la expresión endógena del factor Sp1 en células N2a. Esta reducción de la expresión de Sp1 correlacionó con una disminución del transcrito del receptor P2X7 (Figura 41B). A nivel de proteína se pudo observar un comportamiento similar: la interferencia de la expresión de Sp1 y la reducción de los niveles del receptor P2X7 (Figura 41C-E). Estos datos se correlacionan con lo observado en los experimentos de sobreexpresión y corroboran que Sp1 juega un importante papel en la regulación transcripcional del receptor P2X7 endógeno en células N2a.

2.8. Regulación transcripcional del receptor P2X7 en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales.

A continuación quisimos analizar si los sitios SP1 presentes en el promotor *P2rx7* son funcionales regulando la expresión del receptor P2X7 nativo no sólo en una línea tumoral de neuroblastoma, sino también en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales de ratón. Dado que las neuronas no se transfectan con facilidad ni con la alta eficiencia obtenida en el caso de las líneas celulares, decidimos recurrir a un tratamiento farmacológico para bloquear el acceso de Sp1 a sus sitios de regulación en el ADN. Para ello, se utilizó la mitramicina A, un antibiótico que inhibe selectivamente la actividad transcripcional mediada por Sp1 al unirse a las regiones ricas en GC del ADN (Christensen et al., 2004). El tratamiento con mitramicina A 300 nM durante 24 h redujo drásticamente los niveles endógenos de transcrito del receptor P2X7 tanto en astrocitos como en neuronas (Figura 42A y B). Del mismo modo, los niveles de proteína P2X7 también disminuyeron significativamente en los cultivos de astrocitos y neuronas tratados con mitramicina A durante 48 h (Figura 42C y D). Para analizar si la regulación transcripcional del receptor P2X7 mediada por Sp1 también se produce en células de origen no neural, se realizaron ensayos análogos en la línea de macrófagos RAW 264.7. Como era de esperar, la mitramicina A también redujo significativamente la expresión endógena del receptor P2X7, confirmando así que la regulación transcripcional que Sp1 ejerce sobre el gen *P2rx7* no se limita a células neurales (Figura 42E). Finalmente, aprovechando la capacidad de los astrocitos corticales de ser transfectados por métodos de lipofección, se analizó el efecto de la sobreexpresión de Sp1 sobre los niveles de ARNm y proteína del receptor P2X7. Como se observa en las figuras 42F-H, la sobreexpresión de Sp1 aumentó significativamente la expresión del transcrito y de la proteína P2X7 a las 48 y 72 h postransfección, respectivamente.

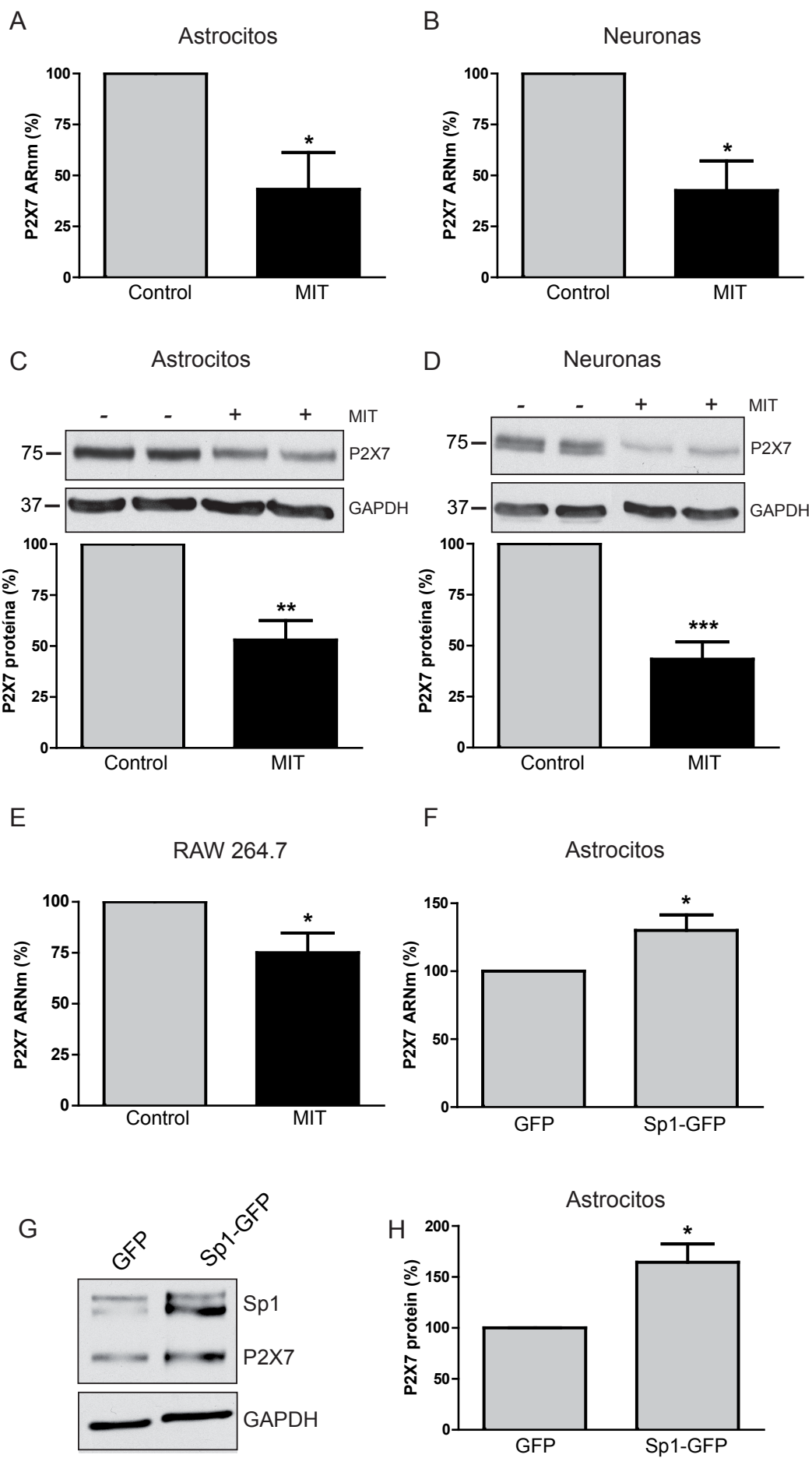


Figura 42. Sp1 regula la expresión del receptor P2X7 nativo en cultivos primarios de neuronas y astrocitos corticales. Los cultivos primarios de astrocitos (A) y neuronas de corteza (B) se trataron durante 24 h con mitramicina A 300 nM (MIT) o vehículo (control). Se extrajo ARN total y se analizó el nivel de ARNm del receptor P2X7 por Q-PCR. Para analizar los lisados celulares se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida de los extractos proteicos de astrocitos (C) y neuronas corticales (D) tratados con mitramicina A 300 nM o vehículo durante 48 h. Como control interno de carga se utilizó GAPDH. (E) Análisis por Q-PCR de la expresión del ARNm del receptor P2X7 en extractos de ARN total de células RAW 264.7 tratadas con mitramicina A 300 nM o vehículo durante 24 h. (F) Análisis por Q-PCR de la expresión del ARNm del receptor P2X7 en extractos de ARN total de astrocitos de corteza transfectados de con el plásmido de sobreexpresión de Sp1 (Sp1-GFP) o el plásmido vacío (GFP) durante 48 h. (G-H) Electroforesis en gel de poliacrilamida de lisados celulares de astrocitos transfectados con el plásmido de sobreexpresión de Sp1 (Sp1-GFP) o el plásmido vacío (GFP) usando anticuerpos anti-P2X7. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes por triplicado. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (test *t* de Student).

2.9. Distribución del receptor P2X7 y del factor Sp1 en cerebro de ratón.

Por el momento todos los estudios llevados a cabo en células en cultivo, ya sean líneas tumorales establecidas o cultivos primarios, han confirmado que la expresión basal del gen *P2rx7* se encuentra regulada por el factor de transcripción Sp1. Para intentar evidenciar que esta regulación también se produce *in vivo*, decidimos analizar la distribución de Sp1 y del receptor P2X7 en el cerebro de ratones neonatos. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratones transgénicos *P2rx7*-EGFP que expresan la proteína fluorescente EGFP bajo el control del promotor de *P2rx7* (Gong et al., 2003). En primer lugar, para confirmar la validez del ratón *P2rx7*-EGFP, se caracterizó la expresión de EGFP en células y tejidos del sistema inmune, donde está ampliamente descrito que existe una elevada expresión nativa del receptor P2X7 (Chen and Brosnan, 2006; Ferrari et al., 2006). Para ello se utilizaron tanto cultivos primarios de macrófagos peritoneales como secciones de bazo de ratones adultos (10 semanas de edad). Se realizó un estudio inmunocitoquímico utilizando anticuerpos anti-CD11 como marcador específico de macrófagos que mostró que este tipo celular presentaba una elevada expresión de la proteína EGFP (Figura 43A). El análisis histológico de las secciones de bazo también puso en evidencia una elevada expresión de la EGFP (Figuras 43B-D), demostrando que, tal y como se esperaba, las células y tejidos de los ratones *P2rx7*-EGFP en los que se conoce que existen altos niveles de expresión del receptor P2X7, también se observa la expresión de la EGFP.

Una vez validado el modelo de estudio, se analizó la distribución de Sp1 y de EGFP en secciones de cerebro de ratón *P2rx7*-EGFP. A nivel de corteza cerebral, se encontró expresión de EGFP en una subpoblación de células corticales localizada principalmente en las capas más superficiales (Figura 44A y E). Los estudios inmunohistoquímicos

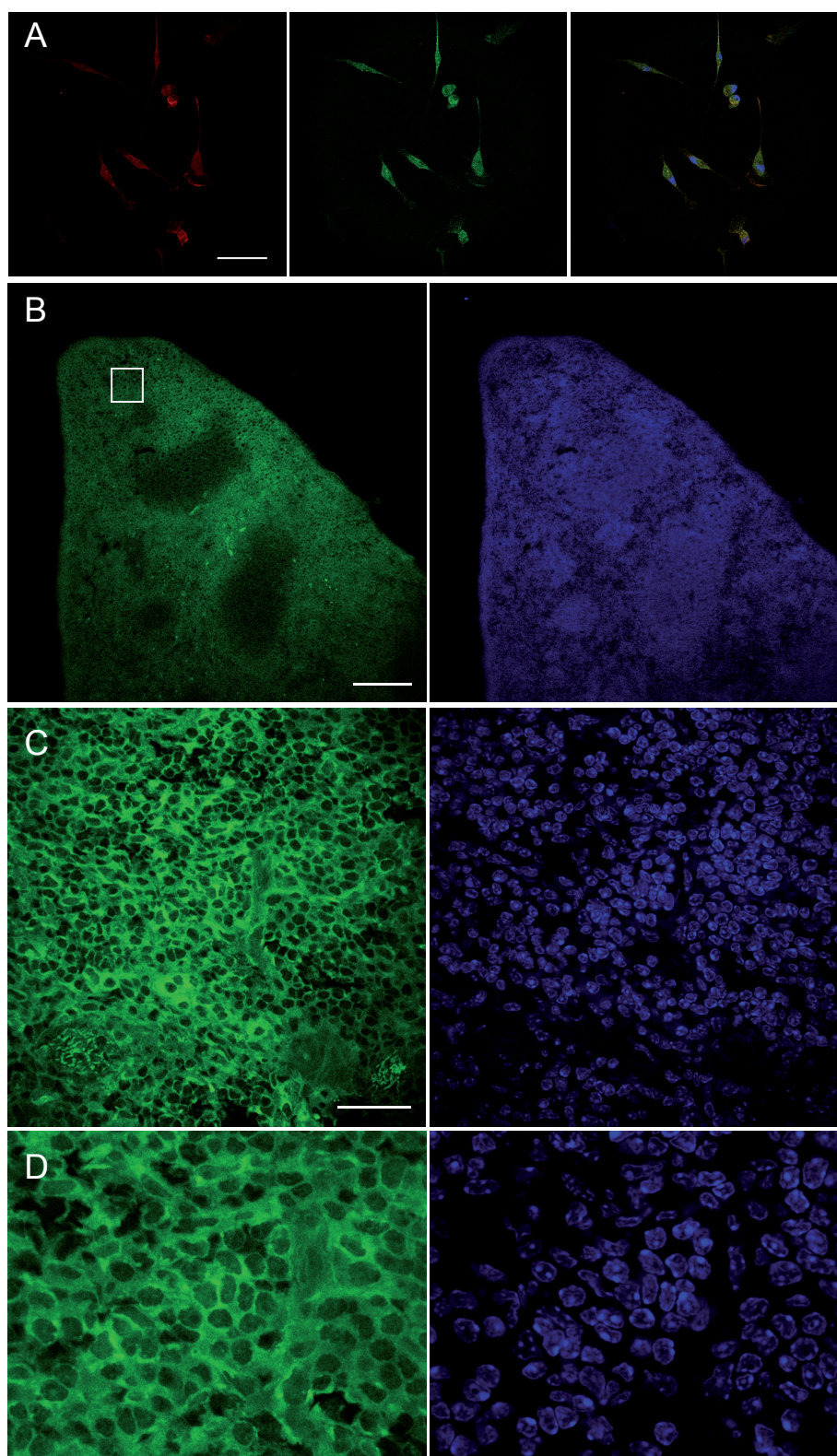


Figura 43. Expresión del receptor P2X7 en cultivo de macrófagos y en bazo de ratón *P2rx7*-EGFP adultos. (A) Microfotografía representativa que muestra el marcador de macrófagos CD11 (rojo) y la fluorescencia de la EGFP nativa (verde) de un cultivo de macrófagos peritoneales de ratones *P2rx7*-EGFP de 10 semanas de edad. Se muestra la imagen superpuesta dónde los núcleos están teñidos con DAPI (azul). Escala = 50 μ m. (B) Microfotografías mostrando la fluorescencia de la EGFP nativa (verde) en bazo de ratones *P2rx7*-EGFP de 10 semanas de edad. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul). Escala = 300 μ m. La selección cuadrada del panel B se muestra ampliada en C y D donde las escalas equivalen a 30 μ m y 15 μ m, respectivamente.

utilizando anticuerpos anti-Sp1 mostraron como era de esperar una expresión basal de Sp1 ampliamente distribuida por toda la corteza cerebral, aunque se detectaron algunas células que mostraban unos de niveles de Sp1 más elevados (Figura 44B y F). Cuando se analizó la correlación existente entre la expresión de EGFP y la existencia de altos niveles de Sp1 se observó que el $76,09 \pm 6,74$ % de las células EGFP positivas presentaban una alta expresión de Sp1 ($n = 68$ células) (Figura 44D y H). Para confirmar esta observación, se examinaron otras áreas cerebrales donde la expresión de EGFP era particularmente intensa, por ejemplo la zona del puente troncoencefálico. En este caso, el $62,81 \pm 9,45$ % de las células EGFP positivas mostraron una elevada expresión de Sp1 ($n = 143$ células) (Figuras 44I-L). Estos resultados confirman que *in vivo* también parece existir una correlación entre la expresión de receptor P2X7 y una mayor expresión del factor de transcripción Sp1.

3. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR IMPLICADA EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL RECEPTOR P2X7.

Una vez identificado Sp1 como el principal factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión basal del gen *P2rx7*, quisimos determinar qué cascadas de señalización intracelular podían regular la expresión del receptor P2X7 a nivel transcripcional y si lo hacen modulando la actividad del factor Sp1 o mediante otros mecanismos. Como se detalla a continuación, para desarrollar nuestro modelo de estudio nos basamos en diversos trabajos que relacionan la ausencia de suero del medio de cultivo con un aumento en la expresión génica dependiente de Sp1 así como con la activación de diversas cascadas de señalización intracelular como consecuencia de la alteración en la composición lipídica de la membrana celular. Es importante recordar que el suero no es exclusivamente una fuente de factores de crecimiento que facilitan la proliferación y la supervivencia de las células *in vitro*, sino que también contiene lipoproteínas encargadas de transportar lípidos como el colesterol y los triglicéridos para formar parte de las denominadas balsas lipídicas o "*lipid rafts*". Estas "*balsas*" funcionan como sitio de andamiaje en la membrana plasmática para diferentes receptores y otras moléculas que participan en cascadas de señalización iniciadas o propagadas desde la membrana. Así, se ha descrito que en células tumorales en cultivo la privación de suero produce una perturbación de la membrana celular debido a la ausencia de colesterol que altera la señalización acoplada a los receptores de tirosina quinasa (Ringerike et al., 2002) como es el caso del receptor de EGF, que puede sufrir una auto-activación independiente de ligando (Furuchi and Anderson, 1998), (Chen

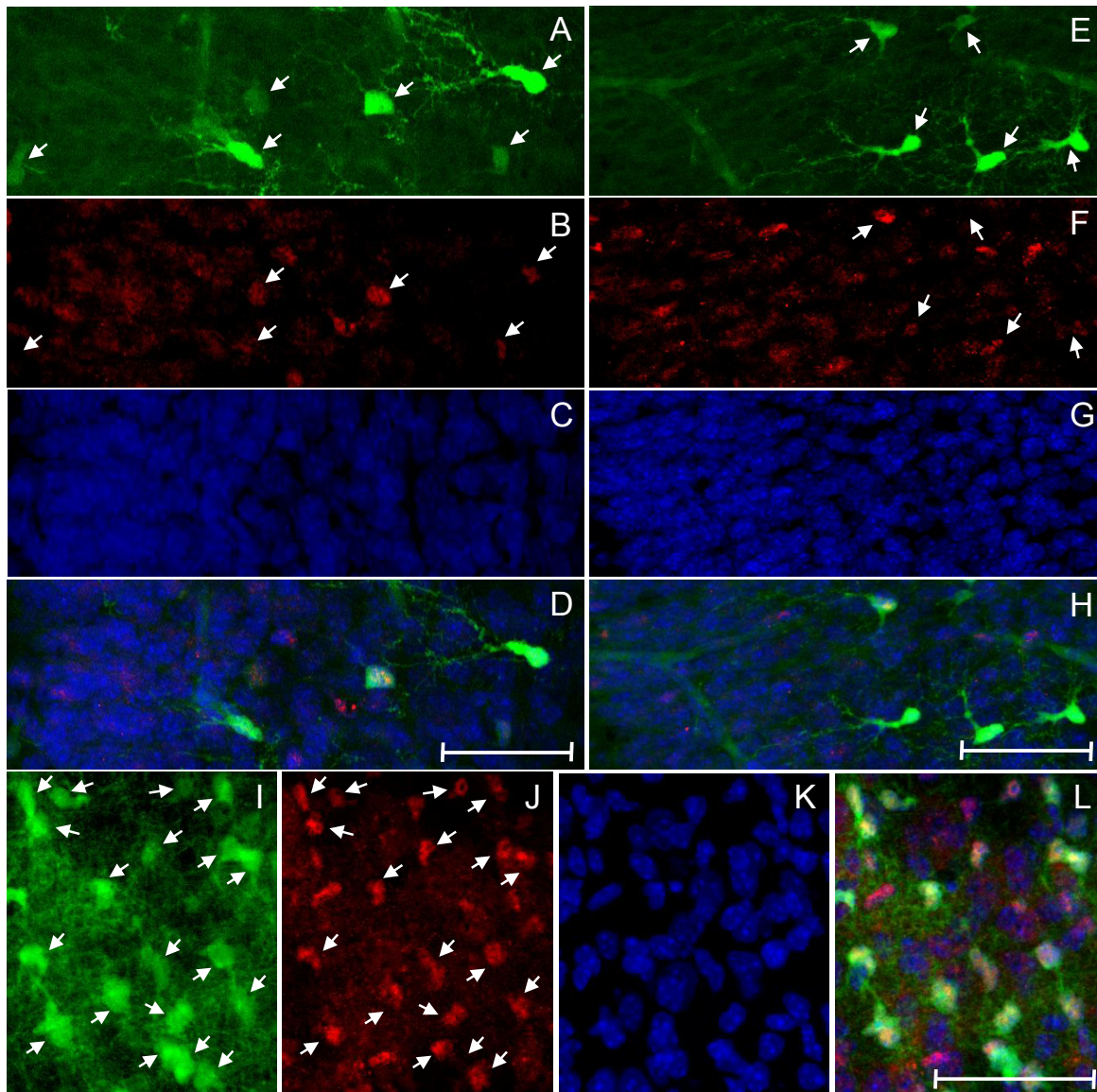


Figura 44. Colocalización in vivo del receptor P2X7 y del factor Sp1 en el cerebro de ratones neonatos *P2rx7-EGFP*. Se muestran microfotografías representativas de la fluorescencia de EGFP (A y E, en verde) y de la inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Sp1 (B y F, en rojo) en diferentes campos de corteza cerebral de ratones *P2rx7-EGFP*. Las flechas señalan la posición de las células positivas para EGFP. Los núcleos están teñidos con DAPI (C y G, en azul). La colocalización de fluorescencias se observa en D y H. Micrografías que muestran la EGFP nativa (I, en verde) y la inmunohistoquímica anti-Sp1 (J, en rojo) en el puente troncoencefálico, una región del cerebro que muestra una elevada expresión del receptor P2X7 en los ratones neonatos *P2rx7-EGFP*. Las flechas indican las células positivas para EGFP, y los núcleos se muestran teñidos con DAPI (K, en azul). La colocalización se muestra en L. Escala = 50 μ m.

and Resh, 2002), (Ringerike et al., 2002), (Roepstorff et al., 2002), (Westover et al., 2003). Por otro lado, la privación de suero facilitaría la apertura de la cromatina y en consecuencia la accesibilidad de los sitios SP1 en el ADN (Pan et al.). Estas evidencias nos hicieron plantearnos qué sucedería con la expresión del receptor P2X7 en células de neuroblastoma N2a en las que se retira el suero del medio de cultivo.

3.1. Efecto de la ausencia de suero en la expresión del receptor P2X7.

Para analizar los efectos de la retirada de suero en nuestro modelo neural, las células N2a se sembraron y dejaron 24 h en medio de cultivo estándar y posteriormente se pasaron a medio sin suero. Transcurridas 24, 48, o 72 h las células se lisaron y se extrajeron el ARN y las proteínas totales para cuantificar los niveles de expresión tanto del factor Sp1 como del receptor P2X7. Se analizó la expresión de Sp1 porque existen numerosos estudios que confirman que la expresión de Sp1 se encuentra autorregulada, ya que presenta sitios SP1 en su propio promotor (Jia et al., 2007; Nicolas et al., 2001; Tapias et al., 2004). Dicha retroalimentación positiva es muy útil si se utiliza como control positivo en nuestros estudios, puesto que un incremento en la actividad transcripcional mediada por Sp1 siempre va redundar en un incremento en los niveles totales de Sp1. Tras 24 h de cultivo en ausencia de suero, se produjo un aumento significativo en la expresión de los transcritos de Sp1 y P2X7 si los comparamos con sus niveles en células que se cultivaron en presencia de un 10% de FBS (Figura 45A y B). Además este incremento se hizo más evidente tras 48 h de privación de suero. Para comprobar si estos aumentos de expresión eran consecuencia de la unión de Sp1 a sus sitios respectivos en las secuencias promotoras de ambos genes, se realizó un tratamiento con mitramicina A 300 nM en el mismo momento de retirar el suero. Como se aprecia en las figuras 47A y B, la mitramicina A no solo redujo los niveles de expresión de ambos transcritos en las células cultivadas con suero, sino que bloqueó por completo el incremento en los niveles de ARNm de Sp1 y P2X7 tras 48 h de cultivo en ausencia de FBS. Cuando se analizaron los niveles de ambas proteínas mediante ensayos Western blot se comprobó que la retirada de FBS del medio de cultivo produjo un incremento rápido (24 h) y transitorio en la expresión de Sp1 así como un aumento mucho más lento del receptor P2X7 que alcanzaba un máximo a las 72 h de cultivo sin suero (Figuras 45C y D). Para confirmar estos resultados, se realizaron estudios inmunocitoquímicos que reprodujeron el aumento observado de Sp1 y del receptor P2X7 de manera secuencial en el tiempo (Figuras 45E-H). Estos resultados indican que, efectivamente, la retirada de suero del medio de cultivo facilita la regulación transcripcional dependiente de Sp1 que se observa tanto sobre la propia proteína Sp1 como consecuencia de su autorregulación, como sobre el receptor P2X7 objeto de nuestro estudio.

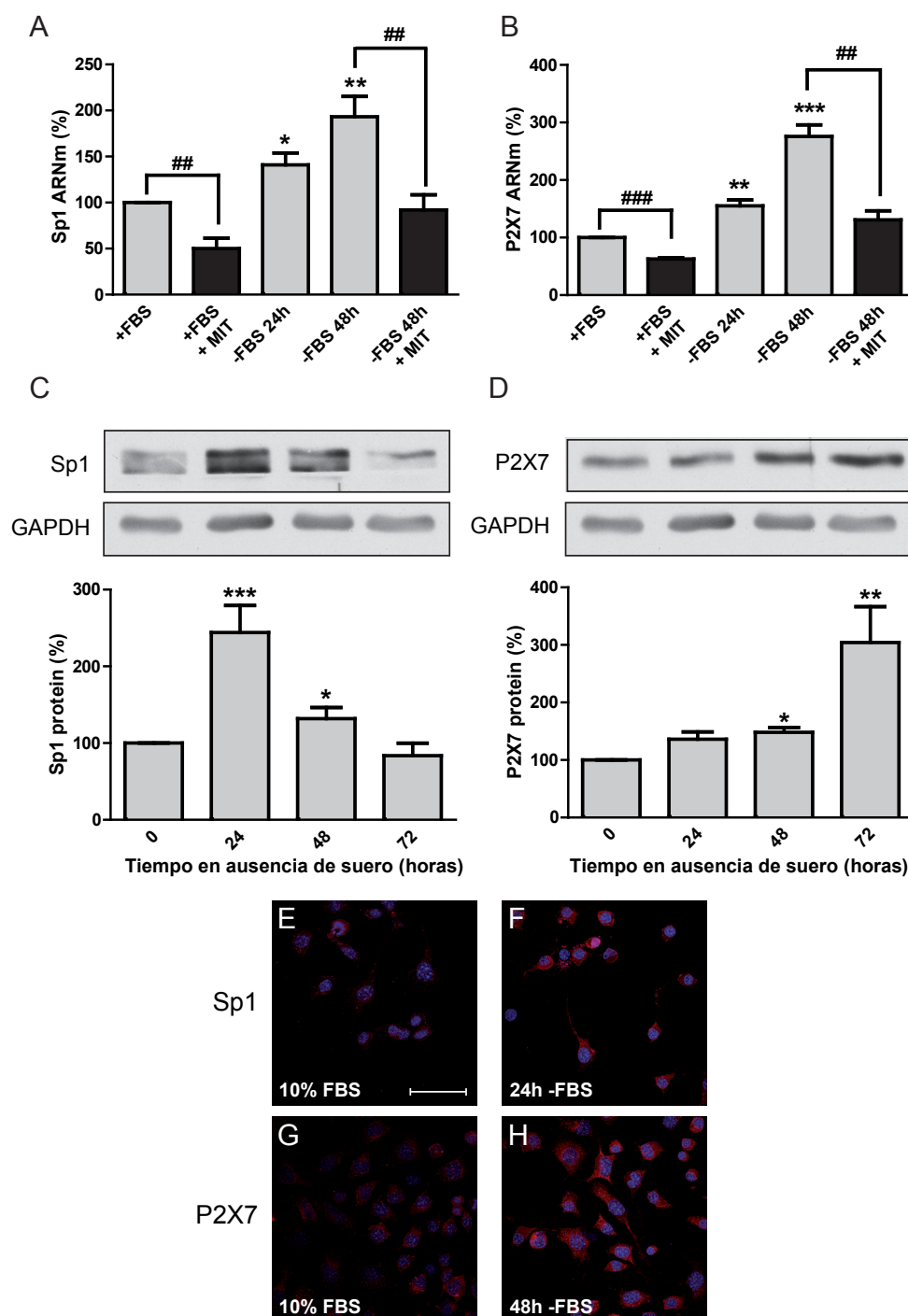


Figura 45. Regulación positiva de la expresión del receptor P2X7 en ausencia de suero. Cambios en el nivel de ARNm de Sp1 (A) y P2X7 (B) en células N2a cultivadas en ausencia de suero durante 24 y 48 h. En algunos casos las células se trataron con mitramicina 300 nM (MIT). Se extrajo ARN total y se analizó el ARNm de Sp1 y P2X7 por Q-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (ANOVA con post-test de Newman-Keuls); ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ (test de la *t* de Student). Cambios en los niveles de proteína de Sp1 (C) y P2X7 (D) en ausencia de suero a los tiempos indicados. Se realizó electroforesis en gel de poliácridamida de extractos de células N2a cultivadas durante 0, 24, 48 y 72 h sin suero. Como control interno de carga se utilizó GAPDH. Los valores representan la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes en duplicado o triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (ANOVA con post-test Newman-Keuls). (E-H) Las células N2a se cultivaron en presencia o ausencia de suero durante 24 o 48 h. A continuación, las células se fijaron y se realizó una inmunocitoquímica con anticuerpos anti-Sp1 (rojo) o anti-P2X7 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala = 50 μ m.

3.2. Implicación del receptor de EGF en la regulación de la expresión del receptor P2X7.

A continuación nos propusimos clarificar las posibles cascadas de señalización intracelular que están interviniendo en la facilitación de la actividad transcripcional de Sp1 y, por lo tanto, en el aumento de la expresión de los genes regulados por Sp1 como sucede con el gen *P2rx7*. Como se ha mencionado previamente, diversos autores han demostrado que el receptor de EGF (EGFR) sufre una auto-activación independiente de ligando tras la retirada del suero del medio de cultivo (Chen and Resh, 2002; Furuchi and Anderson, 1998; Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002; Westover et al., 2003). Partiendo de esta premisa, decidimos estudiar si las vías de señalización acopladas a la activación del EGFR estaban implicadas en la regulación de la expresión del receptor P2X7 dependiente de Sp1. Para ello, las células N2a fueron cultivadas durante 24 ó 48 h sin FBS y en presencia o ausencia de AG1478 1 μ M, un inhibidor del EGFR. Como se observa en la figura 46, la inhibición del EGFR bloquea por completo el aumento del transcrito del receptor P2X7 que se producía en ausencia de FBS, indicando que la activación ligando-independiente del EGFR que se produce tras la retirada de suero es responsable del aumento en la expresión del receptor P2X7.

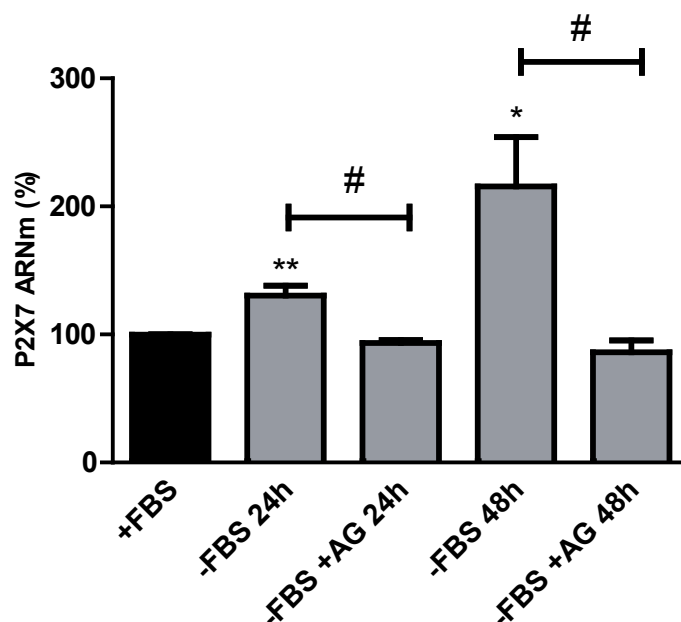


Figura 46. Implicación del receptor de EGF en el aumento de la expresión del receptor P2X7 inducido por la retirada de suero. El tratamiento con el inhibidor del EGFR (AG1478 1 μ M) redujo los incrementos en el nivel de transcrito P2X7 observados en células N2a cultivadas en ausencia de suero durante 24 o 48h. Se extrajo el ARN total y se analizó el ARNm de P2X7 por Q-PCR normalizándolo respecto al contenido en GAPDH. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (+FBS); # $P < 0.05$ (test t de Student).

3.3. Implicación de PI3K en la regulación de la expresión del receptor P2X7.

Una vez demostrado que el EGFR es capaz de regular la expresión del receptor P2X7 en células de neuroblastoma, quisimos analizar qué cascadas de señalización acopladas al EGFR participan en dicha regulación. Los efectores mejor caracterizados que median la señalización intracelular del EGFR incluyen la vía de las MAPK MEK1/2-Erk 1/2 (Moghal and Sternberg, 1999) y la vía de PI3K/Akt (Burgering and Coffey, 1995; Muthuswamy et al., 1999). Para determinar si estas cascadas de señalización estaban implicadas en el incremento de la expresión del receptor P2X7 que se producía tras la retirada de suero, las células N2a se trataron con un inhibidor de Erk1/2 (U0126 10 μ M) o con un inhibidor de PI3K (LY29004 50 μ M). Como se observa en la figura 47A, el tratamiento de las células durante 24 h con el U0126 no tuvo efecto alguno, mientras que el LY29004 redujo en un 50% el incremento del transcrito del receptor P2X7 observado tras la retirada de suero. Para confirmar la implicación de la PI3K en la regulación de la expresión del receptor P2X7 se ensayaron otros inhibidores de esta quinasa como son el inhibidor II de PI3K γ (15 μ M), el inhibidor VIII PI3K α (200 nM) y la wortmanina (250 nM). Como era de esperar, los tres compuestos redujeron significativamente el aumento en la expresión del receptor P2X7 producido por la retirada de suero (Figura 47B). A continuación mediante ensayos de Western blot e inmunocitoquímica se comprobó que en ausencia de suero el tratamiento de las células durante 24 h con LY29004 produjo una disminución en los niveles de proteína del receptor P2X7 del 33% en el ensayo de inmunotransferencia y del 25% en el caso de las inmunocitoquímica (Figura 47C-D). Estos datos indican que la regulación transcripcional de receptor P2X7 en ausencia de suero implica la activación del EGFR y, en consecuencia, la activación de la PI3K.

3.4. Implicación de Akt en la regulación de la expresión del receptor P2X7.

La activación de la PI3K fosforila diversos fosfolípidos de membrana generando fosfoinosítoles como el PIP3 que actúa como un importante segundo mensajero al desencadenar una serie de eventos coordinados implicados en la regulación del crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación (Toker, 2000). En las zonas de la membrana celular donde hay actividad de PI3K, se acumulan muchas proteínas de señalización mediante su unión directa con el PIP3 formado. De entre todas ellas hay dos que destacan por su especial interés, la PDK-1 y la Akt/PKB. En

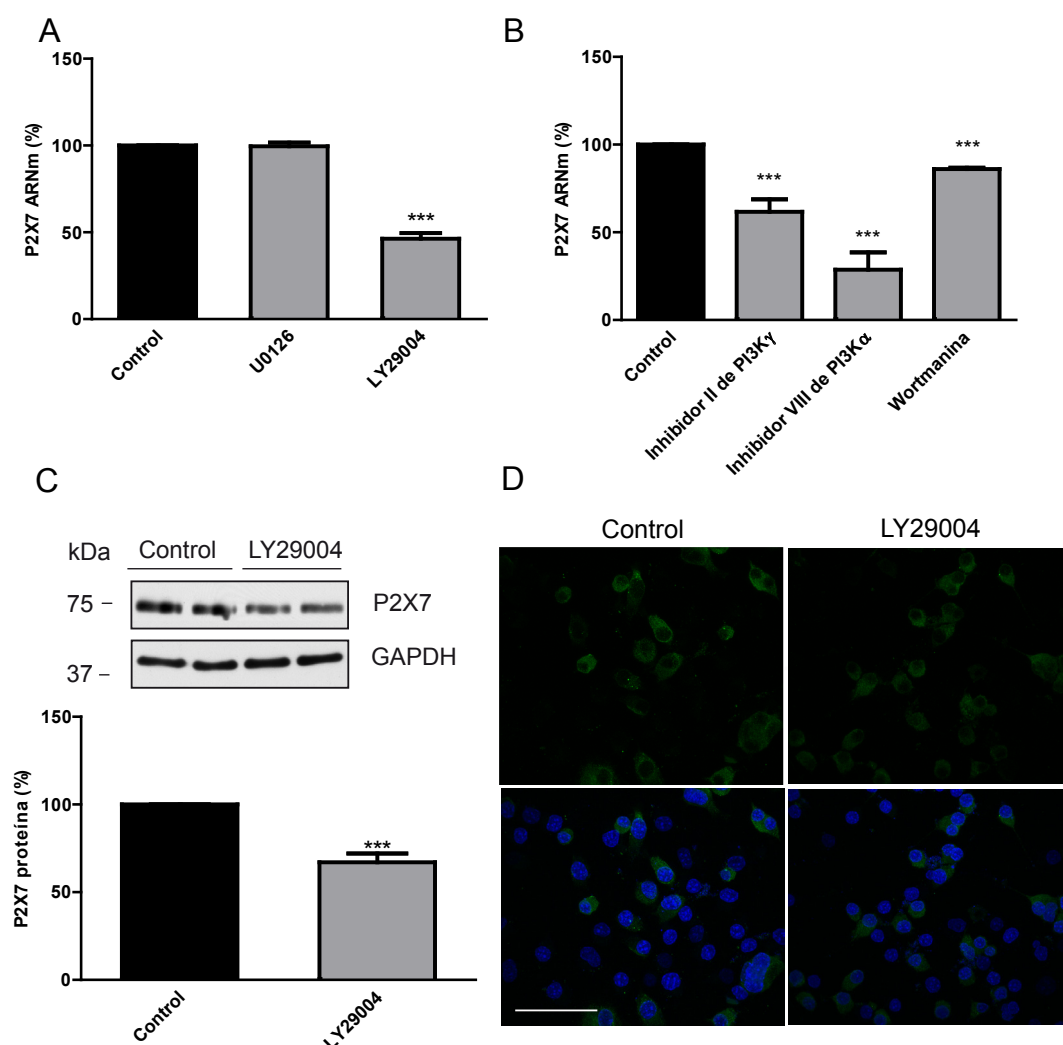


Figura 47. Análisis de las cascadas de señalización acopladas al EGFR que regulan la expresión del receptor P2X7. (A) Nivel de transcrito P2X7 tras el tratamiento de las células N2a durante 24 h con inhibidores farmacológicos de la vías MAPK MEK1/2-Erk 1/2 (U0126 10 μ M) y PI3K/Akt (LY29004 50 μ M). Se extrajo el ARN total y se analizó el nivel de ARNm del receptor P2X7 por Q-PCR normalizándolo respecto al contenido en GAPDH. (B) Efecto de otros inhibidores de la PI3K, el inhibidor II de PI3K γ (15 μ M), el inhibidor VIII PI3K α (200 nM) y la wortmanina (250 nM), en los niveles de ARNm del receptor P2X7. (C) Electroforesis en gel de poliacrilamida de lisados celulares de células N2a tratadas durante 24 h con el inhibidor de PI3K LY29004 50 μ M. Como control interno de carga se analizó el contenido en GAPDH. Los valores representan la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes en duplicado o triplicado. *** P <0.001 (test t de Student). (D) Inmunocitoquímica con anticuerpos para el receptor P2X7 (verde) en células N2a tratadas con LY29004 vs control. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). Escala = 50 μ m.

células quiescentes, la Akt reside en el citosol en una conformación de baja actividad, pero tras la activación de PI3K, es reclutada hacia la membrana celular junto con la PDK-1 dada su facilidad para asociarse con el PIP3 recién formado (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). La fosforilación de Akt por PDK-1 incrementa la actividad catalítica de Akt, convirtiéndola en la principal quinasa efectora de PI3K (Lawlor and Alessi, 2001). Para comprobar si la actividad de Akt se ve incrementada tras la retirada de suero en nuestro modelo celular, se analizaron los niveles de Akt fosforilada en células

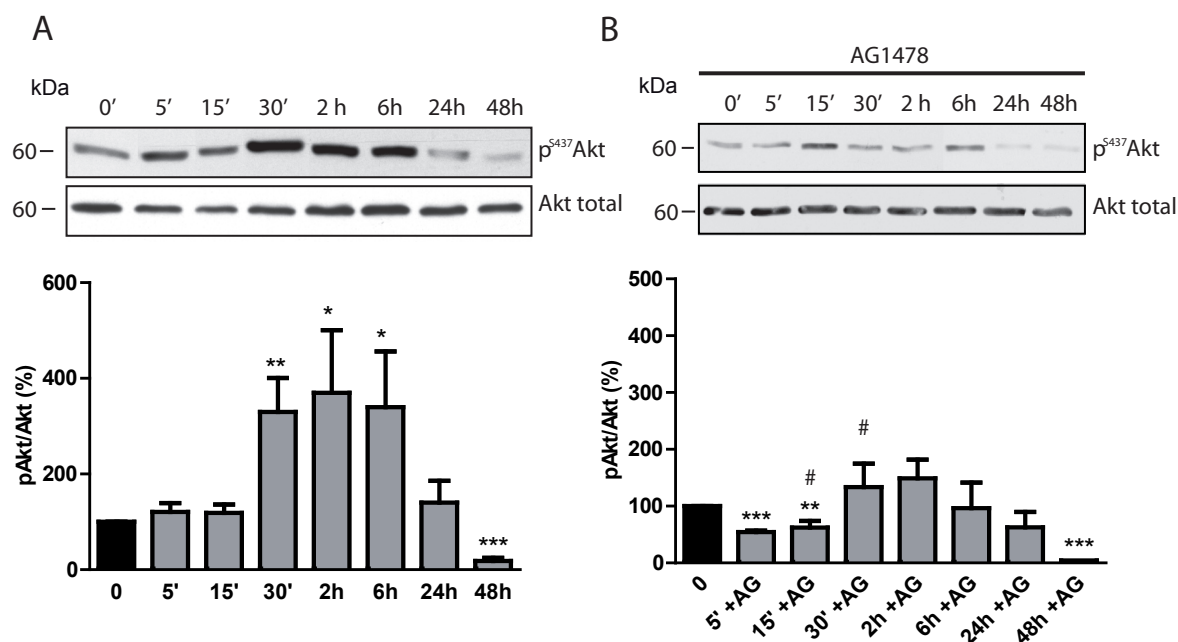


Figura 48. Implicación de la Akt en la regulación de la expresión transcripcional del receptor P2X7. (A) Ensayos de Western blot para realizar el seguimiento temporal de la cinética de fosforilación de Akt (pAkt) tras retirar el suero del medio de cultivo. (B) Electroforesis en gel de poliácridamida de lisados celulares de células N2a tratadas con el inhibidor del EGFR, AG1478 1 μ M, 5 min antes y durante la retirada de suero. Se cuantificaron los niveles de pAkt normalizados frente a la Akt total. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$ vs mismo tiempo en ausencia de AG1478 (test t de Student).

N2a cultivadas en ausencia de FBS a distintos tiempos (5, 15 y 30 min, y 2, 6, 24 y 48 h). Como se aprecia en la figura 48A, la privación de suero, y consecuente activación del EGFR, produce un incremento transitorio en la fosforilación de Akt (pAkt) en el residuo Ser473, alcanzándose un máximo de fosforilación entre las 2-6 h y volviendo a niveles basales a partir de las 24 h después de retirar el FBS del medio de cultivo. Los niveles de Akt total no se vieron modificados a lo largo del ensayo. Como era de esperar, el tratamiento de las células con el inhibidor del EGFR redujo significativamente la pAkt, sin alterar en ningún momento los niveles intracelulares de Akt total (Figura 48B).

Una vez comprobado que la activación del EGFR en ausencia de suero provoca un aumento en la pAkt, quisimos averiguar si la activación de Akt era responsable del incremento en la expresión del receptor P2X7. Para ello las células N2a se trataron durante 24 h con el inhibidor de Akt API-1 10 μ M, y a continuación se analizó la expresión del receptor P2X7. Como se observa en la figura 49, el API-1 redujo significativamente tanto el contenido de ARNm como de proteína del receptor P2X7 en un 95% y 60% respectivamente, confirmando la participación de la vía de señalización PI3K/Akt en la regulación de la expresión de este receptor.

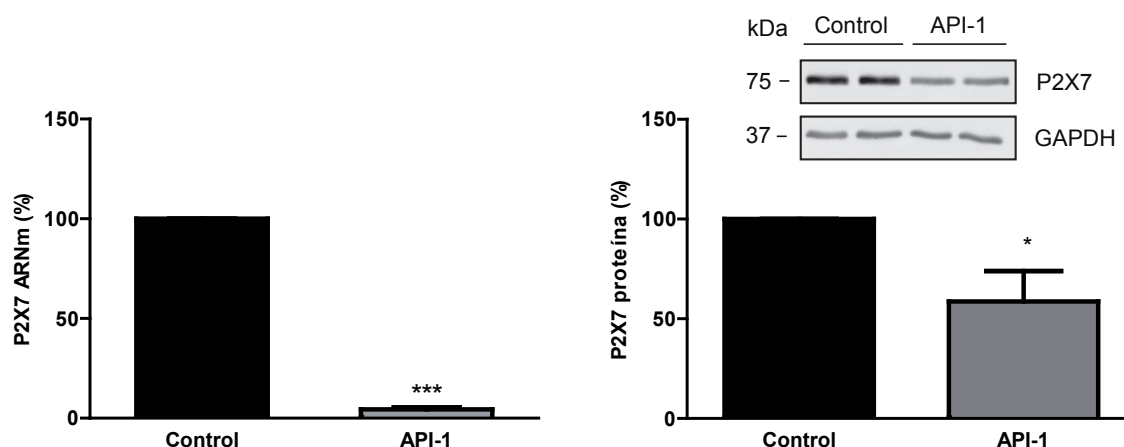


Figura 49. Implicación de Akt en la regulación de la expresión del receptor P2X7 inducido por la retirada de suero. El tratamiento de las células N2a con el inhibidor del Akt (API-1 10 μ M) durante 24h bloqueó el incremento en la expresión del receptor P2X7 observado tras la retirada del suero, tanto a nivel de transcrito (A) como de proteína (B). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (test t de Student).

3.5. GSK3 y mTOR no participan en la regulación de la expresión del receptor P2X7.

Una de las principales quinasas efectoras reguladas por Akt es la GSK3 β . Este enzima interacciona directamente con la proteína Akt activada (van Weeren et al., 1998), produciéndose la fosforilación de GSK3 y, en consecuencia, su inhibición (Cross et al., 1995). La GSK3 está implicada en la regulación de diversos procesos biológicos incluyendo el control del glucógeno, la síntesis de proteínas mediada por insulina y la modulación de factores de transcripción como AP-1 y CREB, entre otras cosas. Dado que la activación de la vía PI3K/Akt está claramente implicada en la potenciación de la expresión del receptor P2X7 tras la retirada de suero, quisimos analizar si la GSK3 β era el siguiente eslabón en la cascada de señales que controlan la transcripción del gen *P2rx7*. Para ello, se realizaron transfecciones transitorias de las células N2a con plásmidos de sobreexpresión de GSK3 β y a las 24 h postransfección se analizaron los niveles de expresión del receptor P2X7 por Western blot. Concretamente se utilizaron 2 construcciones, un pcDNA-GSK3 que permite sobreexpresar la GSK3 salvaje o “wild type” (GSK3wt) y un pcDNA-GSK3S9A que contiene una GSK3 mutada incapaz de ser fosforilada, lo que la convierte en una forma constitutivamente activa de la GSK3 (GSK3S9A). Como se aprecia en la figura 50A, la transfección con pcDNA-GSK3 produjo un incremento significativo en la fosforilación de GSK3 (pGSK3) en los residuos Ser9 y Ser 21, mientras que en la transfección con pcDNA-GSK3S9A sólo se detectó la pGSK3 endógena. Esto se explica porque la forma mutada de GSK3 es incapaz de ser fosforilada en la Ser9, que es uno de los epítomos reconocidos por el anticuerpo comercial utilizado. Sin embargo, se observa que la sobreexpresión de la GSK3wt o de

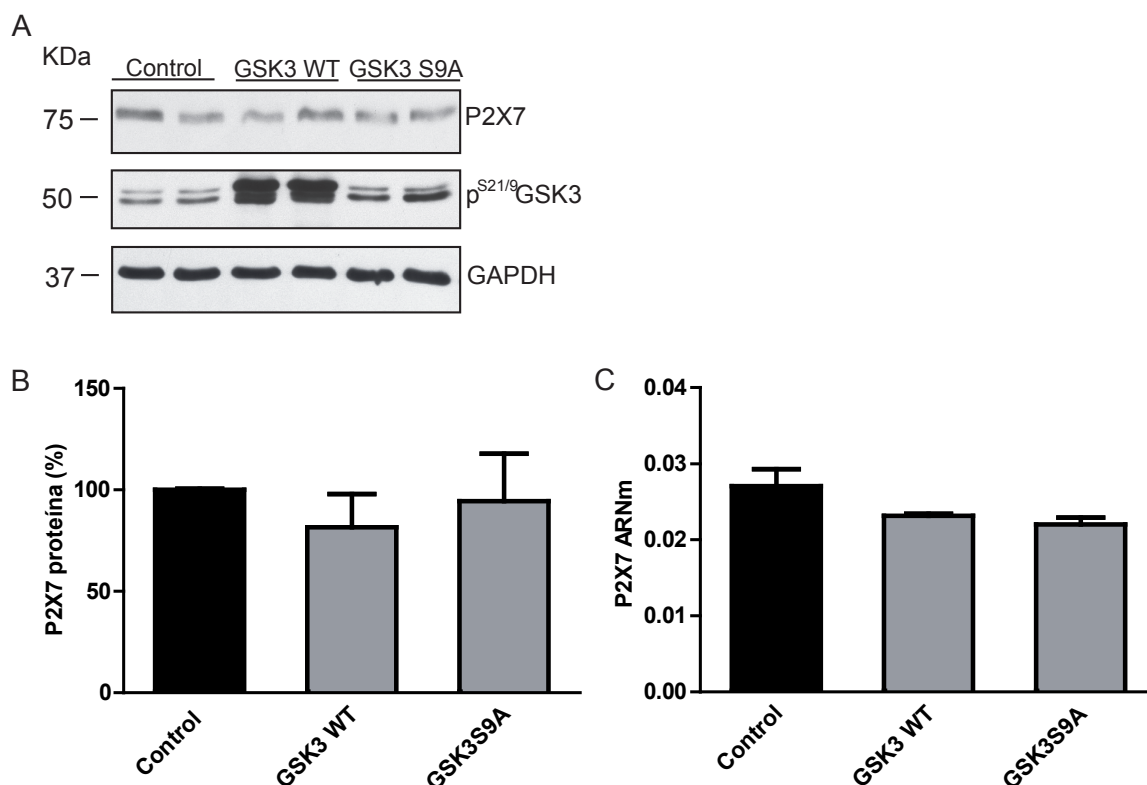


Figura 50. Estudio de GSK3 como proteína efectora de Akt en la regulación transcripcional del receptor P2X7 tras la retirada de suero. (A) Las células N2a se transfectaron transitoriamente con el plásmido de sobreexpresión de la GSK3 salvaje (GSK3 WT), de una GSK3 constitutivamente activa (GSK3S9A) o el plásmido vacío (Control). A las 24 h postransfección se analizó el nivel de transcrito P2X7 por Q-PCR normalizado con GAPDH. (B) Electroforesis en gel de poliácridamida de lisados de células N2a transfectadas con los plásmidos anteriormente mencionados donde se analizaron los niveles del receptor P2X7 y de p^{S21/9}GSK3. Como control interno de carga se analizó el contenido en GAPDH. Como control interno de carga se utilizó GAPDH.

la forma constitutivamente activa GSK3S9A no produjo efecto alguno sobre los niveles de proteína o de ARNm del receptor P2X7 (Figura 50B y C), por lo que descartamos la implicación de la GSK3 en la regulación de la expresión de dicho receptor.

Además de la GSK3, existen otras proteínas efectoras de Akt bien caracterizadas como la serina/treonina quinasa mTOR (del inglés “mammalian target of rapamycin”), que constituye la subunidad catalítica del complejo mTORC1. Akt es capaz de activar este complejo mediante la fosforilación de proteínas intermediarias inhibitoras como TSC1/TSC2 y PRAS40 (Inoki et al., 2002; Kovacina et al., 2003; Vander Haar et al., 2007). Como consecuencia de su activación, mTORC1 acopla la disponibilidad de nutrientes con los niveles de síntesis proteica, el crecimiento celular y la autofagia (Jewell et al., 2013), además de regular la homeostasis lipídica (Ricoult and Manning, 2013). Para analizar la posible participación de mTOR en la regulación de la expresión del receptor P2X7 se utilizó la rapamicina, un antibiótico macrólido capaz de inhibir el complejo

mTORC1 (Brown et al., 1994). Como se observa en la figura 51, el tratamiento de las células N2a con rapamicina 2,5 nM durante 24 h no produjo ningún efecto significativo sobre los niveles de expresión del receptor P2X7, descartando así la participación de mTOR en la regulación transcripcional de dicho receptor.

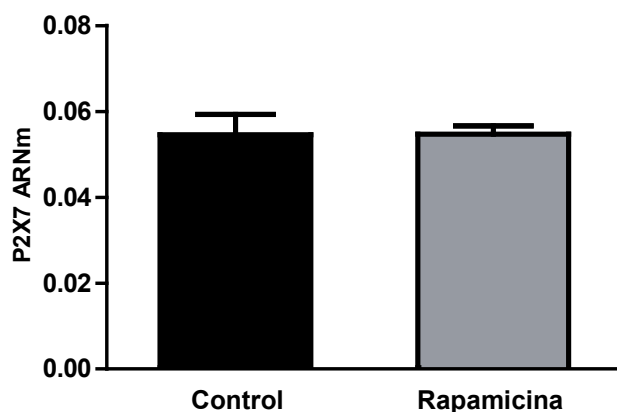


Figura 51. Estudio de mTOR como proteína efectora de Akt en la regulación transcripcional del receptor P2X7 tras la retirada de suero Las células N2a se trataron durante 24 h con el inhibidor de mTOR (rapamicina 2,5 nM) y se analizó el nivel de transcrito P2X7 por Q-PCR normalizado con GAPDH. Ninguno de los tratamientos produjo efectos significativos (test t de Student).

3.6. Implicación de la vía PI3K/Akt en la regulación de la expresión por Sp1.

Como se ha descrito en la introducción, el estado de glicosilación de Sp1 desempeña un papel crucial en la importación de Sp1 desde el citosol hasta el núcleo. Además, una vez en el núcleo, el estado de fosforilación de Sp1 afecta muy significativamente su actividad transcripcional, pudiendo afectar tanto positiva como negativamente la unión de Sp1 al ADN, así como su efecto transactivador de la expresión génica. Puesto que la regulación transcripcional del receptor P2X7 tras la retirada de suero del medio de cultivo parece ser independiente de GSK3, existe la posibilidad de que sea la propia Akt la que regule directamente la actividad de Sp1 mediante su fosforilación. De hecho, varios trabajos describen que existe de una correlación directa entre la activación de la vía de señalización PI3K/Akt y un incremento de la fosforilación y/o actividad transcripcional de Sp1 (Bae et al., 2006; Chen et al., 2009; Pore et al., 2004). Para responder a esta cuestión, las células N2a se trataron durante 24 h en ausencia de suero con el inhibidor de la PI3K (LY29004) o con el inhibidor de la Akt (API-1) y se analizó si estos fármacos eran capaces de alterar los niveles intracelulares de Sp1. Como se observa en la figura 52A y B, ambos inhibidores redujeron muy significativamente la expresión de Sp1, tanto a nivel transcripcional como a nivel de proteína, coincidiendo con lo observado previamente en el caso el receptor P2X7. Dado que Sp1 ejerce su papel regulador dentro del núcleo, se analizaron los niveles de dicho factor en extractos nucleares de células N2a tratadas durante 24 h con los inhibidores de PI3K y Akt. Como se aprecia en la figura 52C, la fracción nuclear de Sp1 también

se reduce significativamente en presencia de dichos inhibidores. Estos resultados apuntan a que la activación de la vía PI3K/Akt favorece la actividad transcripcional de Sp1, lo que conlleva un aumento en la expresión de Sp1 (como consecuencia de su autorregulación) y el consiguiente incremento en la expresión de los genes regulados por este factor, como es el caso del gen *P2rx7*.

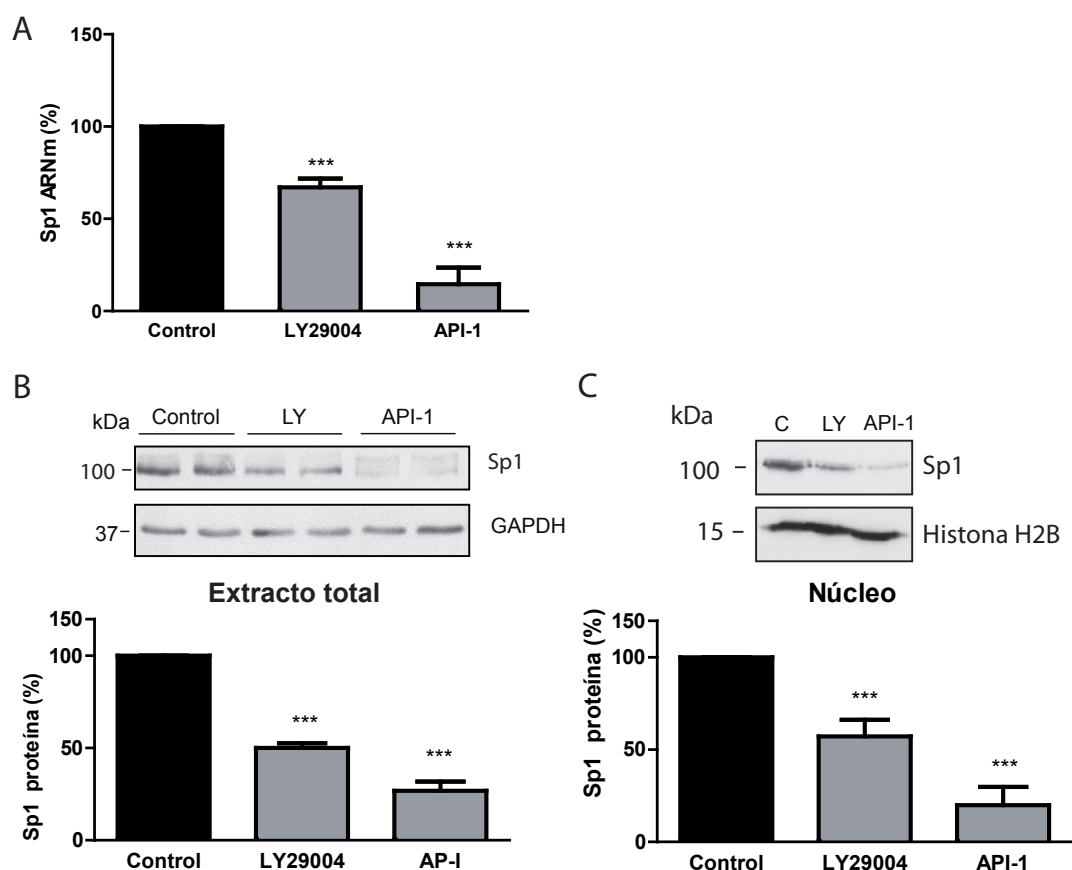


Figura 52. Sp1 está implicado en la regulación de la expresión del receptor P2X7 mediada por la vía PI3K/Akt. (A) Las células N2a se trataron con el inhibidor de PI3K (LY29004 50 μ M) o de Akt (API-1 10 μ M) durante 24 h y se analizó el nivel de ARNm de Sp1 por Q-PCR normalizado con GAPDH. (B) Electroforesis en gel de poliácridamida de extractos de proteína total procedente de células N2a tratadas durante 24 h con los inhibidores LY29004 y API-1. Se cuantificaron los niveles de proteína Sp1 utilizando como control interno de carga la GAPDH. (C) Electroforesis en gel de poliácridamida de extractos de proteína nuclear procedente de células N2a tratadas durante 24 h con los inhibidores LY29004 y API-1. Se cuantificaron los niveles de proteína Sp1 utilizando como control interno de carga la histona H2B. *** $P < 0.001$ (test t de Student).

3.7. Regulación negativa de la expresión del receptor P2X7 por PKC.

Como se ha mencionado previamente, en las zonas de la membrana celular donde hay actividad de PI3K se acumulan muchas proteínas de señalización, entre ellas Akt y PDK-1. PDK-1 es la responsable de fosforilar directamente Akt, pero éste no es su único sustrato. Las PKCs también pueden situarse próximas a la membrana celular y requieren ser fosforiladas para su activación. Existen multitud de evidencias que demuestran que PDK-1 es la encargada de cumplir esta función (Chou et al., 1998;

Le Good et al., 1998). Teniendo en cuenta que la retirada de suero dispara la vía de PI3K/PDK-1/Akt, quisimos averiguar si alguna PKC también estaba implicada en la regulación de la expresión del receptor P2X7. Para ello tratamos las células N2a en ausencia de suero con GF109203X, un inhibidor general de las PKC cuando se utiliza a una concentración de 5 μ M. Transcurridas 24 h se analizó la expresión del receptor P2X7, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Como se muestra en la figura 53A y B, el tratamiento con el GF109203X 5 μ M produjo un incremento del 120% en el transcrito y del 67% en la proteína del receptor P2X7, indicando que alguna PKC está regulando negativamente la expresión de dicho receptor. Los estudios inmunocitoquímicos confirmaron un aumento del 63% en la expresión del receptor P2X7 tras el tratamiento con el inhibidor de las PKC (Figura 53C).

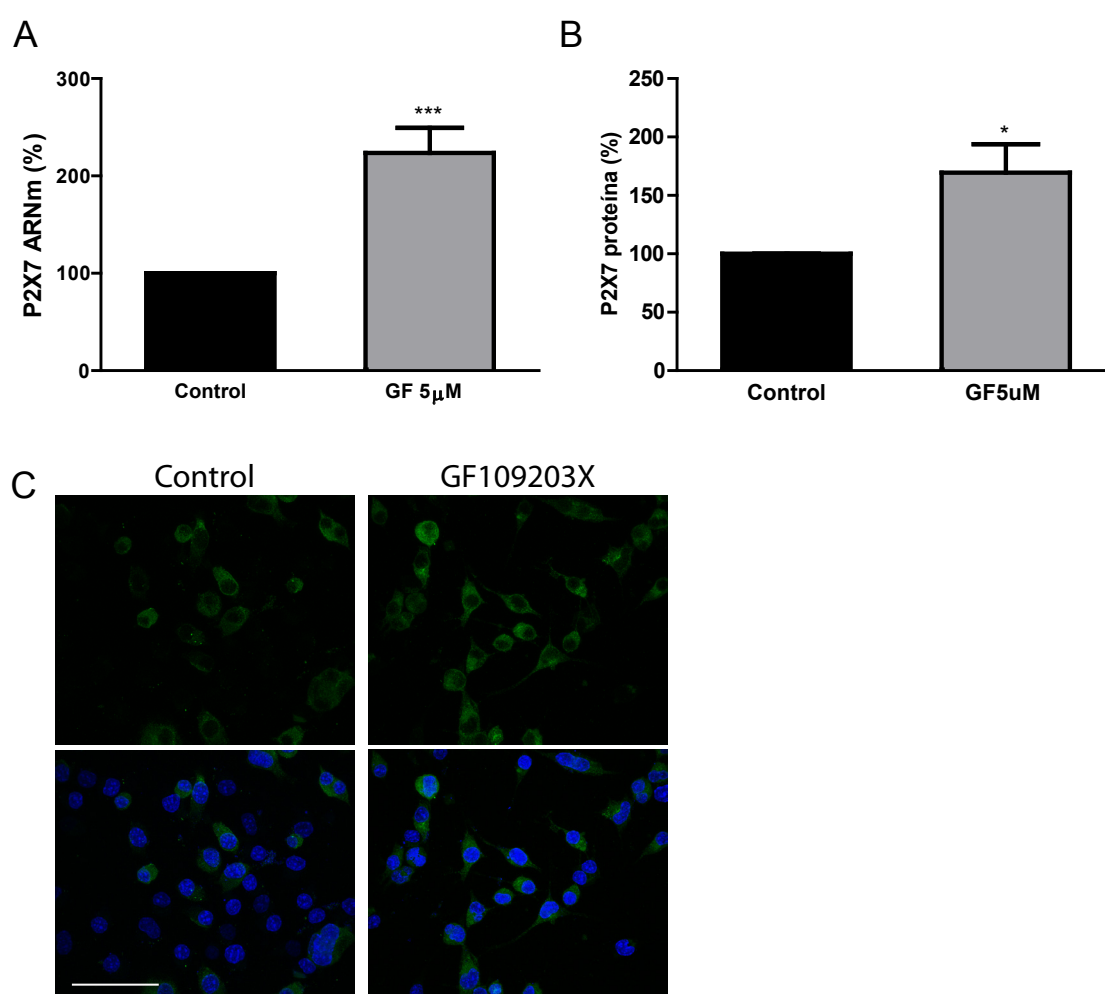


Figura 53. La expresión del receptor P2X7 se encuentra regulada por PKC. (A) Nivel de transcrito P2X7 tras el tratamiento de las células N2a durante 24 h con un inhibidor general de PKC (GF109203X 5 μ M). Se extrajo el ARN total y se analizó el nivel de ARNm del receptor P2X7 por Q-PCR normalizándolo respecto al contenido en GAPDH. (B) Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de proteína total procedente de células N2a tratadas durante 24 h con el inhibidor GF109203X 5 μ M. Se cuantificaron los niveles de proteína P2X7 utilizando como control interno de carga la GAPDH. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (test t de Student). (C) Inmunocitoquímica con anticuerpos para el receptor P2X7 (verde) en células N2a tratadas con GF109203X 5 μ M vs control. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). Escala = 50 μ m.

Para tratar de averiguar el subtipo o subtipos de PKC implicados en este efecto utilizamos una estrategia farmacológica. Cabe recordar que las PKC clásicas requieren calcio y DAG para su activación, las PKC nuevas no requieren calcio pero requieren DAG, y las PKC atípicas no requieren ni Ca^{2+} ni DAG para ser activadas (Toker, 1998). Para llevar a cabo los ensayos, las células N2a se trataron durante 24 h en ausencia de suero con GF109203X 1 μM o con PDBu 200 nM y se analizó si estos fármacos eran capaces de alterar la expresión del receptor P2X7. El GF109203X a una concentración de 1 μM inhibe selectivamente las PKC clásicas, mientras que el éster de forbol PDBu activa tanto las PKC clásicas como las nuevas. Como se observa en la figura 54A, los niveles de ARNm del receptor P2X7 no se vieron alterados por el tratamiento con estos fármacos, lo que descarta la participación de las PKC clásicas y probablemente también de las nuevas. Para confirmar estos resultados se realizaron ensayos análogos a los anteriormente descritos utilizando el U73122, un inhibidor de la PLC. La PLC es un enzima capaz de escindir el 4,5-bifosfo-fosfatidilinositol (PIP_2) para generar inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y DAG. El DAG permanece unido a la membrana y el IP_3 es liberado al citoplasma donde difunde y puede unirse a los receptores de IP_3 del retículo endoplásmico facilitando así la liberación de Ca^{2+} al citosol (Alberts B, 2002). El inhibidor de la PLC, al evitar la formación de DAG e IP_3 , bloquea tanto la activación de las PKC clásicas como de las nuevas. El U73122 fue ensayado a dos concentraciones, 2 y 10 nM, y ninguna de ellas afectó a los niveles de ARNm del receptor P2X7, confirmando así la implicación de una PKC atípica independiente de Ca^{2+} y de DAG en la regulación transcripcional de dicho receptor (Figura 54B).

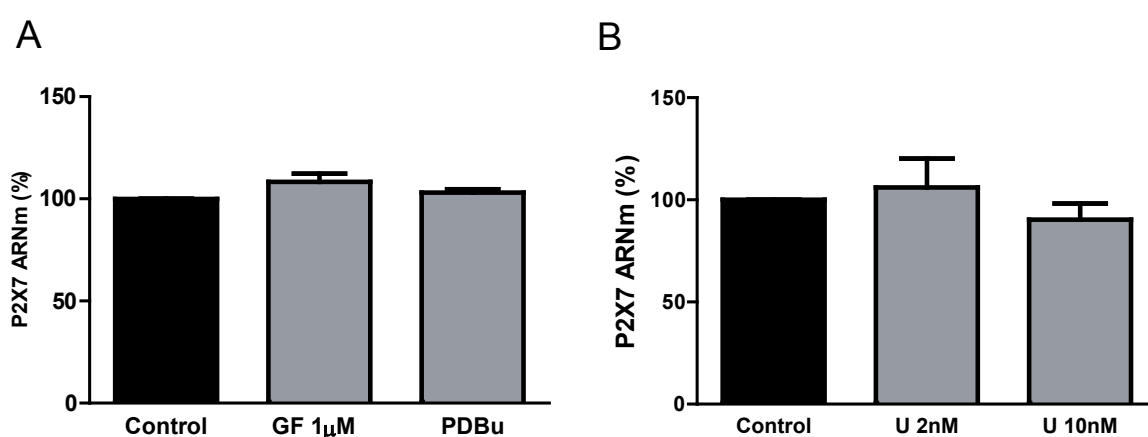


Figura 54. Implicación de una PKC atípica en la regulación de la expresión del receptor P2X7. (A) Las células N2a se trataron con el inhibidor de PKC clásicas (GF109203X 1 μM) o con PDBu 200 nM durante 24 h y se analizó el nivel de ARNm de P2X7 por Q-PCR normalizado con GAPDH. (B) Las células N2a se trataron con el inhibidor de PLC U73122 a las concentraciones indicadas durante 24 h y se analizó el nivel de ARNm de P2X7 por Q-PCR normalizado con GAPDH. Ninguno de los tratamientos produjo efectos significativos (test t de Student).

3.8. Implicación de PKC ζ en la regulación negativa de la expresión del receptor P2X7.

Una vez caracterizada la existencia de una PKC atípica capaz de regular negativamente la expresión del receptor P2X7, quisimos averiguar cuál era la PKC implicada. Hasta la fecha se han caracterizado dos subtipos de PKC atípica, la PKC λ/ι y la PKC ζ . La PKC ι es el equivalente humano de la PKC λ de ratón. Ambas presentan un 98% de homología de secuencia aminoacídica entre sí y comparten un funcionamiento muy similar dentro de sus respectivas especies (Akimoto et al., 1994). Por otro lado, aunque presentan un 72% de homología con la PKC ζ , existen evidencias de que la PKC λ/ι y la PKC ζ no son funcionalmente redundantes y además muestran un patrón de expresión diferente; la PKC λ/ι es ubicua mientras que la PKC ζ muestra un perfil de expresión más restringido (Kovac et al., 2007). Respecto a las cascadas de señalización en las que están implicadas, cabe destacar que la activación de PKC ζ es dependiente de PI3K y se encuentra acoplada a la activación de receptores tirosina quinasa como el receptor de insulina (Bandyopadhyay et al., 2004). Probablemente dicha regulación dependiente de PI3K venga dirigida por PDK-1, una quinasa descrita como la encargada de fosforilar las PKC atípicas (Messerschmidt et al., 2005). Además, existen múltiples datos que demuestran que la PKC ζ es capaz de fosforilar directamente Sp1 y regular tanto positiva como negativamente su actividad transcripcional (Kavurma et al., 2001; Rafty and Khachigian, 2001; Tan et al., 2008; Zhang et al., 2006), hecho que nunca ha sido descrito en el caso de la PKC λ/ι . En base a estas evidencias, parece lógico pensar que la activación de la vía PI3K/PDK-1 producida tras la retirada del suero puede ser la responsable de activar la PKC ζ , que a su vez podría fosforilar Sp1 regulando negativamente su actividad sobre el promotor del gen *P2rx7*. Para analizar esta hipótesis, en primer lugar se analizaron los niveles de PKC ζ fosforilada en células N2a cultivadas en ausencia de FBS a distintos tiempos (5, 15 y 30 min, y 2, 6 y 24 h) para comprobar si la actividad de la PKC ζ se ve modificada durante la privación de suero. La retirada del FBS del medio de cultivo produjo un incremento muy rápido y transitorio en la fosforilación de PKC ζ en el residuo Thr410, alcanzándose un máximo de fosforilación a los 15 min y volviendo a niveles basales a las 6 h (Figura 55A). A continuación, para comprobar si el aumento en la expresión del receptor P2X7 en presencia del GF109203X 5 μ M era consecuencia de la unión de Sp1 al promotor del gen *P2rx7*, se realizó un tratamiento con mitramicina A 300 nM en el mismo momento de retirar el suero y 1 h después se añadió el GF109203X. Como se aprecia en la figura 55B, transcurridas 48 h de tratamiento la mitramicina A bloqueó por completo el incremento en los niveles de ARNm de P2X7 inducidos por el inhibidor general de las

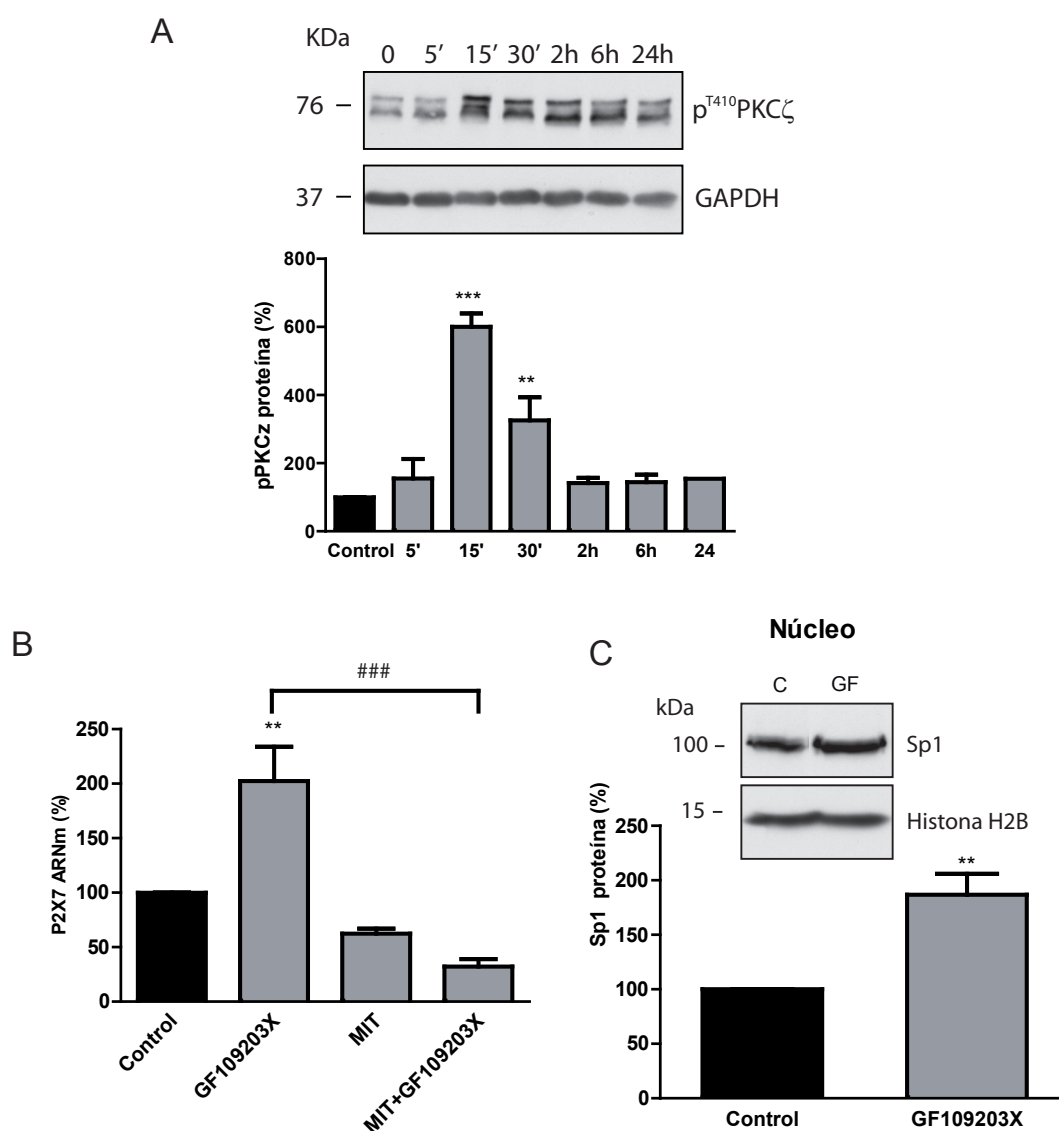


Figura 55. PKC ζ regula negativamente la expresión del receptor P2X7. (A) Ensayos de Western blot para realizar el seguimiento temporal de la cinética de fosforilación de PKC ζ (pPKC ζ) tras retirar el suero del medio de cultivo. (B) Cambios en el nivel de ARNm de P2X7 en células N2a tratadas con GF109203X 5 μ M durante 24 h. En algunos casos las células se trataron con mitramicina 300 nM (MIT). Se extrajo ARN total y se analizó el ARNm de P2X7 por Q-PCR normalizado con GAPDH. (C) Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de proteína nuclear procedente de células N2a tratadas durante 24 h con GF109203X 5 μ M. Se cuantificaron los niveles de proteína Sp1 utilizando como control interno de carga la histona H2B. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, ### $P < 0.0001$ GF109203X vs GF109203+MIT (ANOVA con post-test Newman-Keuls).

PKC. Cuando se analizaron los niveles de Sp1 en extractos nucleares de células N2a tratadas durante 24 h con GF109203X se observó que la inhibición de la PKC ζ produce un incremento muy significativo en los niveles intranucleares de Sp1 (Figura 55C). Estos resultados indican que la retirada de suero del medio de cultivo facilita la activación de la PKC ζ que, a su vez, regula negativamente la expresión del gen *P2rx7* mediante un mecanismo transcripcional dependiente de Sp1.

DISCUSIÓN

Los receptores purinérgicos se encuentran ampliamente distribuidos por todo el sistema nervioso, estando presentes tanto en neuronas como en células gliales. Centrándonos en los receptores ionotrópicos P2X, es bien conocida su participación activa en procesos fisiológicos tan relevantes como la transmisión excitatoria rápida, la regulación de la liberación de neurotransmisores, la proliferación celular y el desarrollo neuronal, así como su implicación en diversas neuropatologías (Burnstock et al., 2011; Glaser et al., 2013). Dentro de la subfamilia de los receptores P2X, destaca el papel que desempeña el receptor P2X7 en el SNC, no sólo por su implicación en la regulación del crecimiento axonal durante el desarrollo embrionario, sino también por su participación en la aparición de diversos desórdenes psiquiátricos y patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o de Huntington (Skaper et al., 2010). También cabe destacar la elevada expresión del receptor P2X7 hallada en la mayoría de los neuroblastomas humanos investigados, donde se pone de manifiesto la implicación de este receptor en la regulación del crecimiento y progresión tumoral (Di Virgilio et al., 2009; Ho et al., 2005; Raffaghello et al., 2006). Todas estas evidencias apuntan al receptor P2X7 como una diana farmacológica o molecular de gran relevancia en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas u oncológicas, siendo necesario profundizar en los mecanismos implicados en la regulación del receptor P2X7 a nivel celular y tisular. En esta tesis doctoral hemos caracterizado un modelo celular que expresa el receptor P2X7 nativo y hemos propuesto un mecanismo de regulación transcripcional que permite modular los niveles de expresión del receptor P2X7 tanto en condiciones basales como en respuesta a señales extracelulares acopladas a cascadas de señalización intracelular bien caracterizadas.

1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR P2X7 EN EL NEUROBLASTOMA DE RATÓN NEURO-2A (N2A)

La limitación del material biológico y la heterogeneidad celular de los cultivos primarios de neuronas frecuentemente suponen una desventaja en la caracterización de vías de señalización y cascadas moleculares. Por esta razón, las líneas celulares de neuroblastoma se utilizan frecuentemente como modelos neurales, ya que mantienen la capacidad de diferenciarse a un fenotipo neuronal y expresan un amplio repertorio de receptores de membrana acoplados a la mayoría de sistemas de segundos mensajeros conocidos. En este trabajo hemos caracterizado la presencia del receptor P2X7 nativo en el neuroblastoma murino N2a no diferenciado mediante métodos moleculares y farmacológicos.

En primer lugar se ha caracterizado la presencia del transcrito y de la proteína correspondientes a la subunidad P2X7 mediante técnicas de PCR cuantitativa y de inmunotransferencia, respectivamente. Con el empleo de un anticuerpo comercial que reconoce el epítipo intracelular KIRKEFPKTQGQYSGFKYPY correspondiente a los residuos 576-595 del receptor P2X7 se detectó una banda de 78 kDa coincidente con el peso molecular esperado para el monómero glicosilado (Roberts et al., 2006). Además se detectó una segunda banda de menor peso molecular (45 kDa) que por su tamaño puede corresponderse con una variante producida por un procesamiento alternativo del ARNm de la subunidad P2X7, tal y como se ha descrito en humanos (Cheewatrakoolpong et al., 2005).

La funcionalidad del receptor P2X7 presente en las células N2a se ha confirmado mediante aproximaciones farmacológicas. Actualmente no existen agonistas ni antagonistas específicos para todos los receptores P2X clonados hasta la fecha, por lo que la identificación de farmacológica de un determinado receptor depende de la combinación de los efectos observados tras el ensayo de diversos compuestos nucleotídicos (revisión (Jarvis and Khakh, 2009)). El receptor P2X7 presenta una baja afinidad por el ATP, con un valor de EC_{50} próximo a 400 μ M (Khakh et al., 2001; North, 2002). Este receptor también es activado por BzATP, siendo este agonista unas 10-30 veces más potente que el propio ATP (Young et al., 2007). Lo más característico del receptor P2X7 es la potenciación de sus respuestas cuando en el medio extracelular se reduce la presencia de cationes divalentes, como el calcio o el magnesio, indicando que, o bien es la forma ATP^{4-} el ligando activo de esta subunidad, o que los cationes divalentes son capaces de inhibir dicho receptor alostéricamente (Surprenant et al., 1996; Virginio et al., 1997). Cuando se ensayaron tanto el ATP 100 μ M como el BzATP 100 μ M en las células N2a en presencia de cationes Mg^{2+} en el medio extracelular, ambos compuestos fueron capaces de inducir un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. El incremento de calcio inducido por ATP fue mucho mayor que el mediado por BzATP, probablemente porque el efecto del ATP se debe principalmente a la activación de los receptores metabotrópicos P2Y presentes en las células N2a (Lakshmi and Joshi, 2006). Esta hipótesis fue confirmada por métodos biofísicos, en colaboración con el grupo del Dr. Rodríguez Artalejo. En conjunto estos datos apuntan claramente a la existencia de un receptor ionotrópico P2X7 funcional en las células N2a. Para averiguar si estas células expresaban otro subtipo de receptor P2X de manera funcional, y dado que en los ensayos de PCR cuantitativa e inmunotransferencia se encontró una elevada expresión de las subunidades P2X1, P2X3 y P2X4, se ensayaron los agonistas α, β -meATP y CTP. Los receptores P2X1 y P2X3 se caracterizan por presentar una cinética de desensibilización

rápida y por ser activados por el α,β -meATP (Garcia-Guzman et al., 1997), mientras que el CTP es un agonista del receptor P2X4 (Soto et al., 1996). Cuando se ensayó el efecto de estos compuestos en las células N2a, no se observaron alteraciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular, indicando que, aunque las proteínas P2X1, P2X3 y P2X4 estén presentes en estas células, no conforman receptores funcionales.

Para corroborar la existencia de un receptor P2X7 funcional se ensayaron algunos compuestos bien caracterizados como antagonistas de este receptor, BBG, A438970 y KN62. El BBG es el antagonista más potente y que mejor permite diferenciar el receptor P2X7 ($\text{IC}_{50} \approx 100$ nM en ratón) (Jiang et al., 2000; Young et al., 2007). El A438070 (de los laboratorios Abbot), con valores de IC_{50} en el nanomolar alto, es otro antagonista selectivo de este receptor (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007; Honore et al., 2006). Y por último, el KN-62 conocido también como inhibidor de la CaMKII (Humphreys et al., 1998). Cuando se ensayó el efecto de estos tres antagonistas se observó que todos ellos eran capaces de inhibir significativamente el incremento de calcio y la corriente iónica inducida por BzATP en ausencia de Mg^{2+} , confirmando así la presencia de receptores P2X7 nativos funcionales en las células N2a (Romagnoli et al., 2008).

2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL RECEPTOR P2X7 POR SP1

2.1. Caracterización de la región promotora del gen *P2rx7*

En el momento de comenzar esta tesis doctoral, los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión del receptor P2X7 a nivel transcripcional se desconocían prácticamente en su totalidad. Los primeros estudios realizados por Buell y col. mostraron que la región de 2 Kb en el extremo 5' del gen *P2RX7* humano contenía una actividad promotora de la expresión (Buell et al., 1998). Posteriormente, dicha actividad promotora se situó en una pequeña región activa situada entre los nucleótidos -158 y +32, aunque no se identificaron los factores de transcripción implicados (Zhou et al., 2009). También se caracterizó la existencia de dos regiones potenciadoras situadas en las posiciones +222/+232 y +401/+573, muy por debajo del promotor activo, y un análisis de secuencia mostró que la región +26/+576 contenía un elevado porcentaje en islas CpG, próximas a los potenciadores, poniendo en evidencia que la expresión del receptor P2X7 humano podía encontrarse regulada por la hipermetilación de estas las islas (Zhou et al., 2009).

En nuestro estudio hemos demostrado que los sitios Sp1 presentes en el promotor del gen *P2rx7* de ratón juegan un papel clave en la regulación de la expresión basal del receptor P2X7 en células neurales. Para caracterizar los mecanismos moleculares que controlan la expresión de este receptor se clonó un fragmento de 2334 pb de la región 5' proximal del gen *P2rx7* (posiciones -2114 a +220 respecto al TSS +1). Un análisis bioinformático mostró que el promotor del gen *P2rx7*, como la mayoría de los promotores eucariotas, no contiene cajas TATA o CAAT. La ausencia de caja TATA es muy frecuente en genes de expresión constitutiva o "*housekeeping*" (Yang et al., 2007) y en genes que dependen de múltiples secuencias reguladoras para su activación (Azizkhan et al., 1993). El análisis *in silico* del fragmento de 2334 pb también reveló la existencia de putativos sitios de unión para diversos factores de transcripción incluyendo AP1, CREB, E-box, HIF, SP1, STAT, TCF/LEF1 e YY1F, lo que sugiere que la expresión de P2X7 se encuentra finamente regulada. De entre todos estos sitios, lo más curioso fue la localización de siete posibles sitios de unión SP1 de especial interés por estar en su mayoría situados en las proximidades del TSS. Numerosos estudios describen que los factores de transcripción pertenecientes a la familia Sp1 reconocen las cajas GC y GT en el ADN y regulan frecuentemente la transcripción de genes de expresión constitutiva cuyo promotor carece de caja TATA o CAAT (Blake et al., 1990; Suske et al., 2005) y cada vez existen más evidencias que apuntan a que la transcripción mediada por factores Sp1 se encuentra regulada en respuesta a una amplia variedad de señales celulares (Black et al., 1999). Además, un análisis computacional a escala genómica indicó que aproximadamente el 76% de los promotores humanos que carecen de caja TATA presentan un elevado contenido en GC y están enriquecidos en sitios de unión SP1 (Yang et al., 2007). Es bien conocido que la metilación de las islas CpG constituye un importante mecanismo de regulación transcripcional en multitud de genes en mamífero (Bird, 1986; Larsen et al., 1992; Siegfried et al., 1999), de forma que el grado de metilación de las islas CpG que en muchos casos colocalizan con los sitios de unión SP1 puede interferir con la unión de Sp1 al ADN, modulando así la transcripción de numerosos genes (Clark et al., 1997). Cuando se analizó con un programa específico la posible presencia de islas CpG en la región 5' proximal del gen *P2rx7* se observó que este promotor no contiene islas CpG, descartando así que la metilación de los sitios SP1 pueda interferir con la unión del factor de transcripción al ADN. Los experimentos de transfección con vectores reporteros de luciferasa mostraron que la región situada entre las posiciones -249 y +17 pb comprende la región promotora mínima. Esta región contiene, además del TSS, cuatro sitios SP1, dos de los cuales (denominados en este trabajo SP1c y SP1d) eran estructuralmente idénticos a la secuencia consenso

definida para SP1 G/T-GGGCGG-G/A-G/A-C/T (Tan and Khachigian, 2009). Un análisis filogenético mediante el alineamiento de secuencias homólogas pertenecientes a distintas especies de mamífero (ratón, rata, macaco, orangután, chimpancé y humano) mostró que los sitios SP1c y SP1d mantienen un alto grado de conservación en todas las especies analizadas, tanto en la secuencia de nucleótidos como en su distancia relativa, lo que sugiere que la regulación transcripcional de *P2X7* por proteínas Sp1 puede ser relevante ya que se ha conservado a lo largo de la evolución (Liu et al., 2004). El fragmento de promotor que contenía el sitio SP1c produjo un incremento de casi 10 veces en la actividad luciferasa cuando se comparó con actividad promotora del vector pGL4.23 vacío, mientras que el fragmento que contenía el sitio SP1d, a pesar de estar localizado en la hebra antisentido, aumentó en más de 3 veces la actividad luciferasa del vector vacío. Los resultados obtenidos en los experimentos de mutagénesis dirigida mostraron que, tanto en células N2a como en macrófagos RAW 264.7, la sustitución de dos nucleótidos centrales en la secuencia de los sitios SP1c y SP1d era suficiente para bloquear la actividad luciferasa inducida por estos sitios SP1, demostrando la importancia de estos sitios en la regulación de la actividad transcripcional del gen *P2rx7* tanto en células neurales como en no neurales. Cabe destacar que se han descrito 40 polimorfismos en la secuencia codificante del gen *P2RX7* humano y más de 12 variantes caracterizadas por producir una alteración en la función del receptor (Jorgensen et al., 2012). Al menos 8 SNPs confieren pérdida de función en la vía de señalización causando defectos funcionales severos (Fuller et al., 2009; Gu et al., 2004), mientras que sólo se ha descrito ganancia de función en 2 de estos polimorfismos (Stokes et al., 2010). Además se han identificado 5 SNPs en la región promotora del gen *P2RX7*, aunque ninguno de ellos parece estar asociado con una alteración de las respuestas a ATP. Sin embargo, estos SNPs puede tener un papel regulador importante ya que un polimorfismo localizado en la posición -762 (T/C) está asociado a una mayor susceptibilidad a la tuberculosis (Li et al., 2002). Esta evidencia permite especular sobre la posible existencia de SNPs todavía no identificados en la región promotora que contiene los sitios SP1 de forma que, una pérdida de estos sitios o la aparición de sitios SP1 nuevos, podrían alterar significativamente la expresión del receptor *P2X7*. Pensamos que el estudio de nuevos polimorfismos presentes en el promotor del gen *P2RX7* podría ser relevante para identificar los mecanismos de regulación que producen una heterogeneidad en las respuestas a ATP en la población humana.

2.2. Efecto de Sp1 sobre la expresión del receptor P2X7 nativo

Actualmente, la familia de factores de transcripción Sp1 está constituida por nueve proteínas (Sp1-9), siendo Sp1 el primer miembro en ser identificado y clonado (Suske et al., 2005). Es bien conocido que Sp1 se regula por glicosilación (Roos et al., 1997) y fosforilación (Tan and Khachigian, 2009), y que es capaz de interactuar directamente con la maquinaria de transcripción basal induciendo la transcripción de sus genes diana (Emili et al., 1994). De manera general se han identificado a Sp1 y Sp3 como los factores principales de unión a cajas GC/GT en diferentes tipos celulares y multitud de promotores. Sin embargo, aunque Sp3 muestra una elevada homología con Sp1, así como una afinidad similar por las cajas GC/GT, existen algunas diferencias funcionales clave. Mientras que Sp1 es un claro transactivador transcripcional, Sp3 puede funcionar como activador en algunos contextos celulares, mientras que en otras condiciones permanece inactivo o incluso es capaz de reprimir la activación mediada por Sp1 u otros factores de transcripción (Bouwman and Philipsen, 2002). Dada la dualidad de Sp3, nuestros experimentos se centraron en la proteína Sp1, considerada el activador transcripcional clásico de los genes que contiene cajas GC.

En experimentos de cotransfección con vectores reporteros de luciferasa se observó que la sobreexpresión de Sp1 produce un aumento en la actividad del promotor analizado. Además, la mutación de los sitios SP1c y SP1d redujo significativamente el incremento en la actividad luciferasa inducida por el promotor del gen *P2rx7*, indicando que el factor de transcripción Sp1 es capaz de regular positivamente la expresión del gen *P2rx7* mediante su unión a los sitios SP1 localizados en la región promotora proximal de dicho gen. Para hacer un estudio más próximo a la realidad del papel que ejerce el factor Sp1 sobre la expresión del receptor P2X7 se analizó la función del promotor en un contexto nativo donde la accesibilidad de los factores de transcripción puede verse comprometida debido a la compactación del ADN en forma de cromatina. En estas condiciones pudimos comprobar que la sobreexpresión de Sp1 era capaz de incrementar los niveles de ARNm y proteína del receptor P2X7 endógeno presente en las células N2a. Además, el silenciamiento de Sp1 con dos ARN de interferencia específicos produjo el efecto contrario, demostrando que Sp1 es un factor esencial para la activación de la transcripción basal del gen *P2rx7* en las células N2a.

Los sitios SP1 se localizan en el promotor de múltiples genes regulados por el ciclo celular y son capaces de regular la proliferación celular a través de una variedad de promotores incluyendo los de las proteínas de unión al factor de crecimiento de

insulina (Kutoh et al., 1999), el factor de crecimiento de endotelio vascular (Milanini et al., 1998), la timidina quinasa (Sorensen and Wintersberger, 1999) y el factor de respuesta a suero (Spencer and Misra, 1999). La implicación de los sitios SP1 en la regulación del ciclo celular se ha confirmado mediante la expresión de una forma truncada de Sp1 que carece del dominio de transactivación. Este dominante negativo es capaz de inhibir el crecimiento de las células HeLa; su efecto está asociado a un aumento en la duración de la fase S de la mitosis, sugiriendo que la transcripción dependiente de los sitios SP1 parece ser particularmente importante en esta fase del ciclo celular (Chen et al., 2000). Curiosamente, dependiendo del promotor analizado la transcripción dependiente de los sitios SP1 puede estar relacionada con cambios tanto positivos como negativos en el crecimiento celular y puede estimular el crecimiento en células quiescentes o inhibir el crecimiento de células en proliferación. Este comportamiento dual puede explicarse por la presencia de sitios SP1 en el promotor de genes proliferativos y de genes implicados en la diferenciación celular (Black et al., 2001). Ya que Sp1 regula el crecimiento en una variedad de tipos celulares y participa en vías implicadas en morfogénesis, no es de extrañar que pueda estar implicado en mecanismos de carcinogénesis. Se ha descrito que la expresión y actividad de Sp1 se encuentra incrementada en carcinomas epiteliales respecto a tumores benignos, sugiriendo su participación en la progresión del tumor (Kaczynski et al., 2003). La mitramicina A es un antibiótico aislado de diversas cepas de bacterias *Streptomyces* usado en el pasado como tratamiento de una variedad de tipos de cáncer incluyendo carcinoma testicular, leucemia mieloide crónica y leucemia mieloide aguda (Koller and Miller, 1986). Más recientemente, la mitramicina A se utiliza en combinación con otros fármacos como agentes inductores de apoptosis, fármacos quimioterápicos o compuesto antiangiogénicos como terapia en cáncer de páncreas y otros tumores (Jia et al., 2007). El mecanismo de acción de la mitramicina implica una unión no covalente a secuencias de ADN ricas en GC evitando la unión de Sp1 a los sitios SP1 localizados

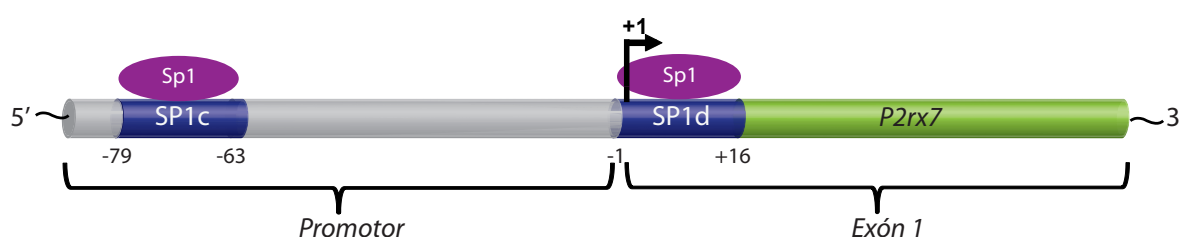


Figura 56. Esquema del promotor funcional del gen murino P2rx7. La unión del factor de transcripción Sp1 a sus sitios en el promotor del gen *P2rx7* favorece su expresión.

en una variedad de promotores de genes implicados en muerte celular, migración celular y reconocimiento inmune de las células tumorales (Seznec et al., 2011). En este trabajo hemos demostrado que el tratamiento con mitramicina A tanto de células de neuroblastoma N2a como de los cultivos primarios de neuronas y astrocitos de corteza conlleva una reducción en los niveles de ARNm y proteína del receptor P2X7. Un resultado análogo se observa en la línea celular de macrófagos RAW 264.7, lo que indica que la regulación transcripcional que Sp1 ejerce sobre el gen *P2rx7* parece no encontrarse restringida a un determinado tejido o tipo celular. Además, la utilización de una línea de ratones transgénicos *P2xr7*-EGFP que expresan la proteína fluorescente bajo el promotor de *P2rx7* nos permitió demostrar que existe una correlación entre la expresión del receptor P2X7 y la elevada presencia de Sp1 a nivel cerebral, al menos en ratones neonatos donde la citoarquitectura del cerebro está todavía en proceso de estructuración (Figura 56). Estos datos están en concordancia con trabajos anteriores que demuestran que Sp1 es esencial para el desarrollo embrionario temprano (Marin et al., 1997) y que su expresión se incrementa durante el desarrollo en los tejidos neurales fetales (Saffer et al., 1991), indicando que Sp1 es un factor clave en la regulación de los procesos de crecimiento y diferenciación.

3. ESTUDIO DE LAS VÍAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DE P2X7.

Una vez identificado Sp1 como el principal factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión basal del gen *P2rx7*, quisimos profundizar en el estudio y analizar las cascadas de señalización intracelular que podían estar implicadas en la regulación transcripcional del receptor P2X7, y si lo hacían a través del factor Sp1 o mediante otros mecanismos. Se ha descrito que la ausencia de suero facilita el acceso a la cromatina favoreciendo la exposición de los sitios SP1. Al unirse Sp1 a sus sitios en el ADN actúa como base de conexión para reclutar a la ARN polimerasa II y aproximarla al promotor favoreciendo la expresión génica (Pan et al., 2010). De acuerdo con esto, un aumento en la expresión del receptor P2X7 generado por la retirada de suero podría deberse a un aumento en la unión del factor a sus sitios SP1 en el promotor *P2rx7*. Para confirmar esta hipótesis analizamos los niveles de P2X7 y Sp1 en células N2a cultivadas en ausencia de suero comparadas con células mantenidas con un 10% de FBS en el medio de cultivo. La privación de suero provocó un aumento significativo en los niveles de ARNm de Sp1 acompañado de un aumento en el nivel de transcrito del receptor P2X7. Estos aumentos fueron inhibidos por la mitramicina A, indicando

que ambos genes se encuentran regulados transcripcionalmente por la unión de Sp1 a sus correspondientes promotores. Curiosamente, aunque los niveles de ambas proteínas se ven incrementados en ausencia de suero, el aumento no se produce de forma simultánea sino secuencial. Esta evidencia podría explicar porque en los ratones *P2rx7-EGFP* neonatos algunas células EGFP positivas no expresan de forma simultánea elevados niveles de proteína Sp1.

Por otra parte diversos estudios revelan que la retirada de suero lleva a las células a un estado de diferenciación y es capaz de producir la activación de cascadas de señalización. Así, diversos tipos celulares como los mioblastos (Ma et al., 1998), los gliomas (Fan, 1983) y los neuroblastomas (Conti et al., 2001) sufren un proceso de diferenciación al cultivarse *in vitro* en ausencia de suero. Sin embargo, de forma general, las células en cultivo se mantienen en medio con suero ya que éste contiene factores de crecimiento peptídicos que facilitan el crecimiento, la proliferación y la supervivencia de las células *in vitro*. Pero estos factores de crecimiento peptídicos no son el único componente importante del suero, también existen lipoproteínas, como el colesterol y los triglicéridos, cuya función es fundamental para el transporte de lípidos o que están implicadas en la activación de diversas vías. Por ejemplo, la lipoproteína de alta densidad (HDL) promueve la proliferación de células tumorales y estimula múltiples vías de señalización; por otro lado el colesterol juega un importante papel en la transducción de señales, ya que su depleción desintegra las balsas lipídicas que sirven como andamio para el anclaje de los receptores tirosina quinasa (RTKs) y otras proteínas intermediarias en las cascadas de señalización. La rotura de estas balsas lipídicas puede tanto inhibir como activar la señalización mediada por RTKs (Paratcha and Ibanez, 2002). En las células N2a se ha descrito que la retirada de suero induce la autoactivación del EGFR y la diferenciación mediada por la vía de PI3K/Akt, siendo ambos procesos revertidos por la adición de HDL (Evangelopoulos et al., 2005). Para comprobar si el EGFR estaba implicado en el aumento de la expresión de Sp1 y del receptor P2X7 en las células N2a que se observa tras la retirada del suero, se ensayó el inhibidor específico AG1478. Este compuesto bloqueó por completo el aumento del transcrito del receptor P2X7 que se producía en ausencia de FBS, indicando que la vía de señalización acoplada al EGFR es fundamental en la regulación de la expresión del receptor P2X7.

Como se ha mencionado en la introducción, entre de los efectores mejor caracterizados que median la señalización intracelular acoplada al EGFR se encuentra la vía de MEK1/2-Erk1/2 (Moghal and Sternberg, 1999). Para analizar la posible

implicación de esta cascada de señalización, las células N2a se trataron con el inhibidor de Erk1/2 U0126 y se analizó la expresión del receptor P2X7. Este inhibidor no tuvo efecto en los niveles de transcrito del receptor, lo que nos ha permitido descartar su implicación en la regulación de la expresión del receptor P2X7. Otro de los efectores bien caracterizados del EGFR es la vía de PI3K/Akt (Burgering and Coffey, 1995; Martín-Orozco et al., 2007; Muthuswamy et al., 1999). Cuando analizamos el efecto de los inhibidores de PI3K y Akt (LY29004 y API-1, respectivamente) en las células N2a se observó que ambos compuestos redujeron muy significativamente el incremento en la expresión del receptor P2X7 que se produce al retirar el FBS del medio de cultivo. Estos resultados correlacionan bien con la observación, de que la ausencia de suero en células N2a induce un aumento progresivo y transitorio en los niveles Akt fosforilada que es dependiente de la activación del EGFR. Se ha descrito que un incremento en la actividad de PI3K, debido bien a la activación del EGFR o bien a la pérdida de regulación por PTEN, es capaz de aumentar la expresión de diversos genes como es el caso del gen que codifica el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Maity et al., 2000; Pore et al., 2004), por lo que parece lógico pensar que un mecanismo similar puede estar regulando la transcripción del gen *P2rx7* en las células N2a.

Una vez iniciada la vía PI3K/Akt, la proteína Akt activada puede fosforilar multitud de efectores incluyendo la quinasa GSK3 β . La activación de Akt es necesaria y suficiente para la fosforilación e inactivación de GSK3 (Cross et al., 1995; van Weeren et al., 1998). La sobreexpresión en células N2a de la GSK3 wt o de una versión constitutivamente activa de GSK3 (mutación S9A) no produjo cambios ni en la cantidad de ARNm ni de proteína del receptor P2X7, indicando que GSK3 no está implicada en la regulación transcripcional del gen *P2rx7*. Otro efector bien conocido de Akt es la quinasa mTOR dentro del complejo proteico denominado mTORC1. La cascada de señalización Akt/mTORC1 es clave en la regulación de la proliferación y la supervivencia celular (Bhaskar and Hay, 2007) y despierta un gran interés como diana farmacológica ya que se encuentra desregulada en muchos tipos de cáncer (Boulay and Lane, 2007M; Chiang and Abraham, 2007). El complejo mTORC1 es inhibido por rapamicina (Beuvink et al., 2005) y está implicado en la activación de la síntesis proteica a través de la modulación de la quinasa de la proteína ribosomal S40 (Boulay and Lane, 2007; Chiang and Abraham, 2007). El tratamiento de las células N2a con rapamicina no produjo cambios en el transcrito del receptor P2X7. Esto nos permite concluir que mTOR1 no participa en la regulación transcripcional del gen *P2rx7*, aunque no podemos descartar que pueda ejercer algún papel en la regulación de su síntesis proteica.

Dado que ninguno de los efectores clásicos de Akt parecen intervenir en la regulación transcripcional del gen *P2rx7*, pensamos que era posible que Akt regulase la expresión del receptor mediante la fosforilación directa de Sp1. Se ha descrito que en la mayoría de los casos la fosforilación de Sp1 se produce en el interior núcleo (Majumdar et al., 2006), por lo que sería necesaria la translocación a núcleo de Akt para poder fosforilar Sp1 e inducir así su actividad transcripcional. Existen evidencias en células PC12 que demuestran que el factor de crecimiento neural (NGF) provoca la activación de Akt y favorece su translocación a núcleo donde fosforila a sus proteínas diana (Borgatti et al., 2003). La fosforilación de Akt en los residuos Lys179, Thr308 y Ser473 es necesaria tanto para la translocación en sí como para su retención en el núcleo. Además, empleando inhibidores y una variedad de mutantes de PI3K se ha demostrado que la actividad de PI3K es necesaria para la correcta translocación nuclear de Akt (Xuan Nguyen et al., 2006). Por otro lado, aunque no existe una evidencia directa que demuestre que Akt fosforila Sp1, se han encontrado claros indicios que asocian la activación de Akt con un aumento en la fosforilación de Sp1 (Bae et al., 2006; Chen et al., 2009; Pore et al., 2004). En nuestros estudios, el tratamiento de las células N2a con los inhibidores de PI3K y Akt redujo el transcrito de Sp1 significativamente, lo cual se traduciría en una menor cantidad de proteína Sp1 tanto en extractos proteicos totales como en la fracción nuclear. Estos datos confirman la implicación de Sp1 en la regulación transcripcional de *P2X7* a través de la vía de señalización de PI3K/Akt.

Por otro lado, en las zonas de la membrana celular donde hay actividad PI3K, se acumulan muchas proteínas de señalización con dominios de homología a plextrina por unión directa con el PIP3 formado por la acción de esta quinasa (Nakanishi et al., 1993). De entre todas las proteínas reclutadas a la membrana, además de Akt, destaca por su especial interés la PDK-1. La PDK-1 es la responsable de fosforilar directamente Akt (Lawlor and Alessi, 2001), pero éste no es su único sustrato. Las PKC también requieren ser fosforiladas para activarse y existen multitud de evidencias que demuestran que la PDK-1 es la encargada de cumplir esta función (Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998; Toker, 2003) siendo responsable de fosforilar el lazo de activación de las PKC, controlando así los niveles de PKC madura (Dutil et al., 1998). Para averiguar si alguna PKC participaba en la regulación transcripcional del receptor *P2X7*, las células N2a se trataron con el inhibidor general de PKC GF109203X. Este compuesto provocó un aumento significativo en la expresión del receptor *P2X7* indicando que alguna PKC estaba implicada en dicha regulación. Con el empleo de diversos fármacos se pudo discriminar que la regulación transcripcional del receptor *P2X7* estaba regulada por una PKC atípica que no requiere ni Ca^{2+} ni DAG para ser

activada (Toker, 1998). Hasta la fecha hay descritas dos PKC atípicas: PKC λ/ι y PKC ζ . Aunque ambas PKC presentan un 72% de homología, existen evidencias de que la PKC λ/ι y la PKC ζ no son funcionalmente redundantes y además muestran un patrón de expresión diferente: la PKC λ/ι es ubicua mientras que la PKC ζ muestra un perfil de expresión más restringido (Kovac et al., 2007). Además, la eliminación de los genes para PKC ζ y PKC λ/ι tiene efectos muy diferentes en el desarrollo embrionario del ratón. El ratón deficiente de PKC λ/ι tienen un fenotipo letal durante el período embrionario (E9) (Bandyopadhyay et al., 2004), mientras que el deficiente de PKC ζ es viable y se desarrolla con normalidad, mostrando sólo deficiencias a nivel inmunológico (Leitges et al., 2001; Soloff et al., 2004). En estudios embrionarios PKC λ/ι muestra una actividad transcripcional amplia y general durante el desarrollo del embrión, aunque en estadios avanzados su actividad va disminuyendo. Por el contrario los niveles de transcrito de PKC ζ son generalmente más bajos en todas las etapas embrionarias estudiadas, y a partir de E12,5 su expresión llega a ser altamente específica con una distribución clara en cerebro y otras regiones corporales (Kovac et al., 2007). Por otro lado, a diferencia de la PKC λ/ι , existen innumerables trabajos que demuestran que la PKC ζ es capaz de fosforilar directamente Sp1, regulando positivamente su actividad transcripcional (Dwivedi et al., 2010; Kavurma et al., 2001; Rafty and Khachigian, 2001; Reisinger et al., 2003; Tan et al., 2008; Zhang et al., 2006). Además, se ha descrito que la activación de PI3K induce la translocación de PKC ζ al núcleo (Calcerrada et al., 2002; Neri et al., 1999), y estudios de coimmunoprecipitación han demostrado que PKC ζ y Sp1 forman parte de un mismo complejo proteico (Zhang et al., 2006). Existen datos que indican que la fosforilación de Sp1 por PKC ζ se produce en la región de dedos de zinc de Sp1 (Pal et al., 1998), y que la fosforilación de Sp1 en los residuos Thr668, Ser670 y Thr681 inducida por PKC ζ favorece la unión de Sp1 a sus sitios en el promotor de los genes diana (Tan et al., 2008). En base a todas estas evidencias, parece lógico pensar que PKC ζ puede ser la PKC atípica implicada en la regulación de la expresión del receptor P2X7. En una primera aproximación se analizaron los niveles de fosforilación de PKC ζ en las células N2a tras la retirada de suero del medio de cultivo y, efectivamente, se observó un aumento rápido y transitorio en la fosforilación de PKC ζ , indicando que la privación de suero induce la activación de la PKC ζ . Para comprobar si PKC ζ regula la expresión del gen *P2rx7* vía Sp1, las células N2a se pretrataron con mitramicina A antes de añadir el inhibidor de PKC, observándose que la mitramicina era capaz de inhibir el aumento de expresión del receptor P2X7 inducido por el GF109203X. Estos datos indican que la PKC ζ regula la expresión de dicho receptor inhibiendo la unión de Sp1 a sus sitios en el promotor del gen *P2rx7*.

Sin embargo desconocemos el mecanismo implicado en la regulación del receptor P2X7 por PKC ζ y basándonos en la literatura existente nos planteamos dos posibilidades. Por un lado, como se ha mencionado previamente, PKC ζ puede fosforilar directamente Sp1 regulando así su actividad transcripcional. Si bien es cierto que en la mayoría de los casos descritos la fosforilación de Sp1 por PKC ζ produce un aumento de la expresión génica dependiente de Sp1 (hecho que iría en contra de lo observado en nuestro modelo experimental), cabe destacar que existen algunos trabajos que apoyan una posible regulación negativa de Sp1 por PKC ζ . Por ejemplo, la transfección de células pancreáticas con un dominante negativo de PKC ζ muestra una cinética bifásica. El bloqueo parcial de PKC ζ aumenta la expresión del gen *VEGF*, mientras que el bloqueo casi total de PKC ζ reduce la transcripción dicho gen (Neid et al., 2004). En otro estudio se observa que la sobreexpresión de PKC ζ inhibe la unión de Sp1 al promotor *p21WAF1/Cip1* y, en consecuencia, reduce la expresión de la proteína p21WAF1/Cip1 inducida por ésteres de forbol (Pivoriunas et al., 2007). Por otro lado, se ha descrito que la activación de PKC ζ está asociada al secuestro de Akt, a través del dominio de homología a plextrina de Akt, y por lo tanto, al bloqueo de la señalización mediada por la vía de señalización PI3K/Akt (Breitkreutz et al., 2007; van Blitterswijk et al., 2003). La expresión de una PKC ζ inactiva reduce la formación del complejo, mientras que la expresión de una Akt inactiva aumenta significativamente la interacción PKC ζ -Akt, sugiriendo que la actividad de Akt podría inducir la disociación del complejo. Está descrito que la sobreexpresión de PKC ζ impide la activación de Akt inducida por el factor de crecimiento derivado de plaquetas, mientras que la expresión de un dominante negativo de PKC ζ aumenta en más de 7 veces la actividad de Akt (Doornbos et al., 1999).

Además desconocemos cuál es el mecanismo implicado en la activación de la PKC ζ en las células N2a. Podemos especular sobre dos posibles vías de activación basándonos en los datos recogidos en la literatura. Por un lado, se ha descrito una activación de PKC ζ dependiente de PI3K/PDK-1 (Bandyopadhyay et al., 2004; Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998; Messerschmidt et al., 2005; Toker, 1998). En este caso la PKC ζ requiere para su activación la fosforilación de su lazo de activación (Thr410) y la autofosforilación del residuo Thr560 que estabiliza la subunidad catalítica en una conformación activa (Messerschmidt et al., 2005). Como segunda opción, se ha descrito que las ceramidas interaccionan directamente con el dominio rico en cisteína de la PKC ζ (Bieberich et al., 2000), induciendo su activación de manera independiente de PI3K (Bourbon et al., 2002). Las ceramidas son segundos mensajeros lipídicos que se forman a partir de los esfingolípidos de membrana por acción de la esfingomielinasa

(Spence, 1993). Estos compuestos lipídicos participan, dependiendo del tipo celular, en la regulación de diversos procesos como el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (Goodman and Mattson, 1996; Kolesnick and Kronke, 1998; Riboni et al., 1995). Las ceramidas se generan en respuesta a agentes proapoptóticos como citoquinas, radiaciones ionizantes, luz UV, choque térmico y estrés oxidativo (Spiegel et al., 1996). Además, las situaciones de estrés celular como la retirada de suero del medio de cultivo puede inducir la síntesis de ceramidas (Albi et al., 2006; Colombaioni et al., 2002). Curiosamente, se ha descrito que las ceramidas inhiben el crecimiento celular mediante la inhibición de Akt tanto *in vivo* como *in vitro* (Charles et al., 2000; Salinas et al., 2000; Schubert et al., 2000). Respecto al mecanismo de acción propuesto, se sabe que las ceramidas activan directamente la PKC ζ , induciendo la asociación de Akt y PKC ζ . Dicha interacción inhibe la fosforilación de Akt y en consecuencia su activación (Bourbon et al., 2002). Otros estudios indican que la PKC ζ es capaz incluso de inhibir la actividad de una Akt constitutivamente activa no regulada por fosforilación (Doornbos, 1999). Además, existen evidencias de que la asociación de Akt y PKC ζ inducida por ceramidas previene específicamente el reclutamiento de Akt a la membrana, lo que podría alterar la formación del complejo PI3K/Akt favoreciendo la defosforilación y la inactivación de Akt (Cazzolli et al., 2001).

A modo de resumen, y basándonos en los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, podemos concluir que en condiciones óptimas de cultivo, donde el medio extracelular es rico en factores tróficos y componentes lipoproteicos que mantienen la estabilidad de la membrana, existe una expresión basal de P2X7 dependiente de Sp1 que mantiene a las células de neuroblastoma en un estado proliferativo. Cuando se retira el suero del medio de cultivo, se produce una activación del EGFR independiente de ligando y se activa la vía de PI3K/Akt que en última instancia es la responsable de fosforilar y activar Sp1. Paralelamente, la privación de suero induce la activación de PKC ζ (ya sea de forma dependiente de PI3K/PDK-1 o dependiente de ceramidas), que regula negativamente la expresión del receptor P2X7 (ya sea fosforilando Sp1 o secuestrando Akt). El resultado neto de la privación de suero es un aumento en la expresión del receptor P2X7 dependiente de Sp1 (Figura 57).

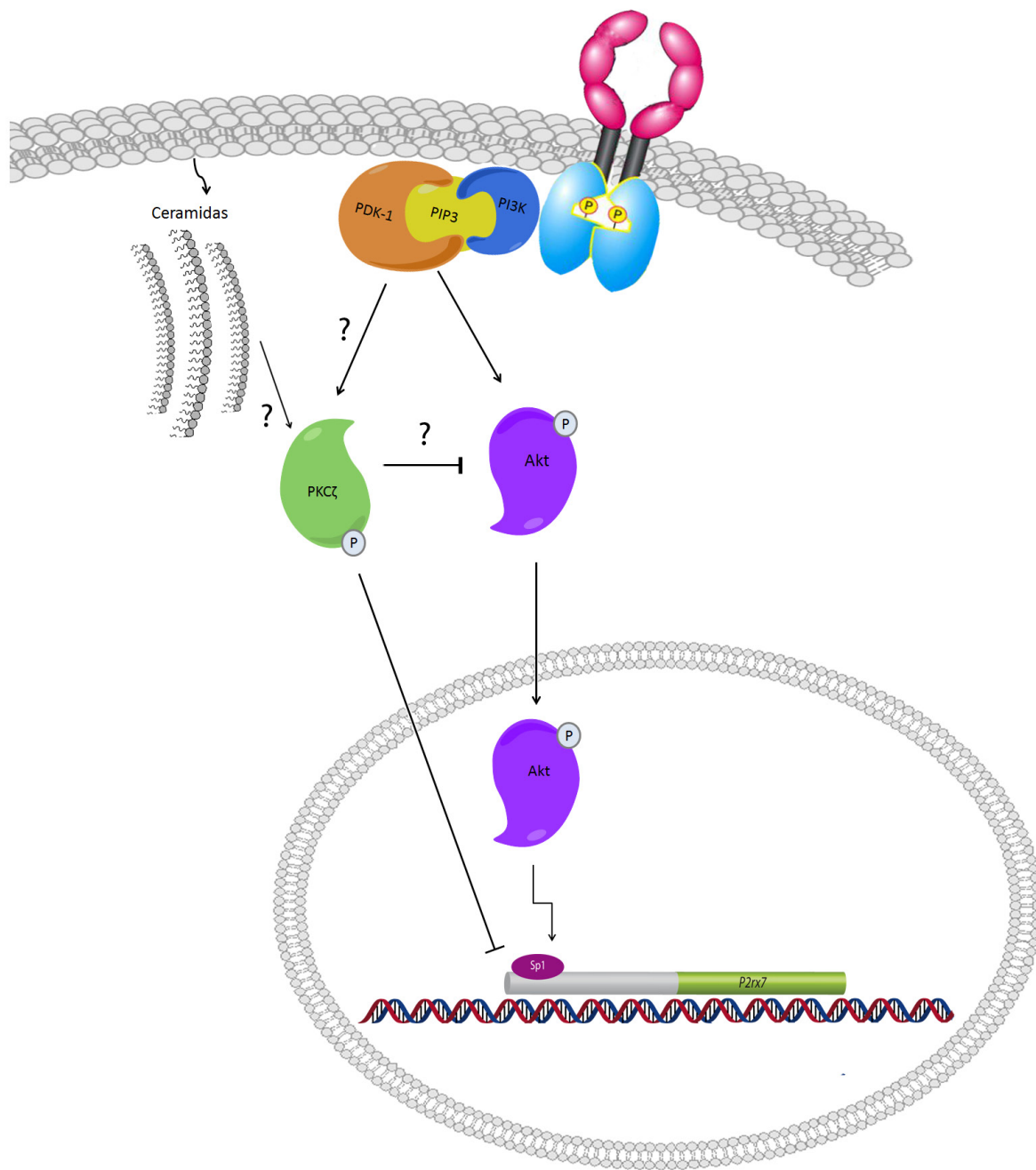


Figura 57. Esquema resumen de la regulación transcripcional del receptor P2X7 en células neurales. Al retirar el suero del medio de cultivo, se produce una auto-activación del receptor de EGF independiente de ligando activando la vía de PI3K/Akt. A través de Akt se produce la fosforilación y consecuente activación del factor de transcripción Sp1. De forma paralela, la privación de suero induce la activación de PKCζ (ya sea de forma dependiente de PI3K/PDK-1 o dependiente de ceramidas), que regula negativamente la actividad de Akt. Como resultado final de la privación de suero se produce un aumento en la expresión del receptor P2X7 dependiente de Sp1.

4. IMPLICACIONES PATOLÓGICAS DE LA VÍA EGFR/PI3K/AKT/SP1/P2X7 EN NEUROBLASTOMAS Y OTRAS CÉLULAS TUMORALES.

La vía de señalización que se ha caracterizado en esta tesis doctoral comprende al menos 3 componentes celulares claramente involucrados en procesos de carcinogénesis: el receptor de EGF, el factor Sp1 y el propio receptor P2X7.

Centrándonos en el componente purinérgico, cabe destacar que se han detectado niveles elevados del receptor P2X7 en diversos tipos de tumores, incluyendo melanomas, cánceres colorectales, de mama, de tiroides, prostáticos, hematológicos y cerebrales (Adinolfi et al., 2012; Sun, 2010; White and Burnstock, 2006). Muchos grupos de investigación han puesto de manifiesto el importante papel que ejerce el ATP como mediador entre el huésped y el tumor. Parece que tanto el ATP como la adenosina se acumulan en el microambiente que rodea al tumor como resultado de pequeñas pérdidas debidas a un daño inespecífico de la membrana o bien por un flujo a través de vías específicas de permeabilización, hecho que no resulta sorprendente ya que el ATP tiene un papel bien caracterizado como indicador de peligro y mediador proinflamatorio. Obviamente, dependiendo de la concentración de ATP, su tasa de degradación a adenosina y el conjunto de receptores purinérgicos expresados en las células tumorales y en las células inflamatorias infiltradas, la acumulación de ATP en el medio extracelular puede tener efectos beneficiosos o perjudiciales para el portador del tumor. El desarrollo de una luciferasa de membrana plasmática ha resultado clave para poder cuantificar la concentración de ATP extracelular *in vivo* (Pellegatti et al., 2005). Gracias a esta herramienta molecular ha sido posible demostrar que la concentración de ATP en el ambiente extracelular que rodea un tumor es próxima a 100 μ M (Pellegatti et al., 2008). Estas concentraciones serían suficientes para estimular tónicamente al receptor P2X7 a pesar de su baja afinidad por el ATP. Los niveles extracelulares de ATP así como el tipo celular objeto de estudio son cruciales para determinar el efecto que puede ejercer la activación del receptor P2X7, ya que dependiendo de su nivel de activación puede estar implicado en fenómenos de proliferación o de muerte celular (Di Virgilio et al., 2009; White and Burnstock, 2006). Por ejemplo, en algunas células inmunitarias la estimulación del receptor P2X7 a concentraciones muy elevadas de ATP provoca la formación de un poro catalítico que permite la entrada no selectiva de iones y moléculas de gran tamaño que activan metaloproteasas y caspasas, causando un potente efecto citotóxico (Di Virgilio, 1995; Ferrari et al., 1999; Filippini et al., 1990). Por el contrario, concentraciones más fisiológicas de ATP como las cuantificadas en el entorno de un tumor producirían una estimulación suave y tónica del receptor P2X7

que se ha asociado con una mayor tasa de supervivencia y/o proliferación de las células cancerosas (Adinolfi et al., 2010; Di Virgilio et al., 2009; Stagg et al., 2011). También se ha observado un efecto proliferativo del receptor P2X7 en células no tumorales como en los cultivos de linfocitos T humanos, donde la estimulación de receptores nucleotídicos P2X7-like promueve el crecimiento celular (Baricordi et al., 1996; Baricordi et al., 1999). Dentro de los tumores de origen neural en los que se ha descrito una elevada expresión del receptor P2X7 se encuentran los neuroblastomas, uno de los tumores extracraneales más frecuentes en la infancia (Brodeur, 2003). La mayoría de los neuroblastomas primarios analizados y varias líneas celulares humanas de neuroblastoma expresan el receptor P2X7, y su activación induce cambios morfológicos dosis-dependientes como la pérdida de neuritas, la retracción del cuerpo celular y la vacuolización del citoplasma (Raffaghello et al., 2006). Estos eventos son transitorios y no se asocian con fenómenos apoptóticos, sugiriendo que estos mecanismos son una estrategia de supervivencia. De hecho, se ha demostrado que la sobreexpresión del receptor P2X7 supone una ventaja a nivel de crecimiento y supervivencia en condiciones adversas de cultivo y existen evidencias de que un pequeño aumento en los niveles mitocondriales y citoplasmáticos de Ca^{2+} juegan un papel crucial en esta función (Adinolfi et al., 2002; Baricordi et al., 1999; Sun, 2010). En el neuroblastoma N2a, los receptores P2X7 se acoplan a fenómenos de exocitosis regulando la dinámica de las vesículas de secreción. De hecho se ha demostrado que la estimulación del receptor P2X7 provoca la liberación vesicular de ATP, sugiriendo la existencia de una retroalimentación positiva entre receptor/ligando que mantendría unos niveles elevados de ATP extracelular en el entorno de las células tumorales, induciendo a su vez la activación tónica del receptor P2X7 (Gutierrez-Martin et al., 2011). Parece claro que la liberación de ATP es un proceso inherente al metabolismo de las células tumorales y estrechamente ligado a la inmunidad antitumoral (Ghiringhelli et al., 2009). Una de las características más interesantes del efecto trófico del receptor P2X7 es su papel en la supervivencia y el crecimiento celular en ausencia de factores de tróficos. Como se ha mencionado previamente, la mayoría de los tumores malignos sobreexpresan el receptor P2X7, hecho que se asocia con una tasa de crecimiento *in vivo* acelerada, una mayor liberación de VEGF, una red vascular más densa y una tendencia aumentada a metastatizar (Adinolfi et al., 2012; Jelassi et al., 2011). Estudios *in vitro* demuestran que la sobreexpresión del receptor P2X7 favorece la proliferación celular en ausencia de FBS, efecto que depende de la estimulación autocrina/paracrina inducida por el ATP liberado (Baricordi et al., 1999). Se ha descrito que la sobreexpresión del este receptor favorece un incremento en el potencial de membrana de la mitocondria,

en el calcio basal mitocondrial y en el contenido intracelular de ATP, confiriendo a la célula la capacidad de proliferar en ausencia de factores tróficos (Adinolfi et al., 2005). Además, el silenciamiento o la inhibición farmacológica del receptor P2X7 ralentiza la progresión tumoral (Adinolfi et al., 2012).

En lo referente al factor de transcripción Sp1, es bien sabido que se expresa de forma ubicua en los tejidos de mamífero y que regula la actividad de múltiples genes implicados en procesos celulares como la diferenciación, la progresión del ciclo celular y la oncogénesis (Li and Davie, 2010). Es frecuente observar una desregulación de la actividad de Sp1 y Sp3 en numerosos cánceres y se ha demostrado que la supervivencia de los pacientes que muestran unos niveles tumorales elevados de Sp1 se reduce significativamente cuando se compara con la de pacientes con baja expresión de este factor (Wang et al., 2003). Algunos de los primeros fármacos antitumorales utilizados en clínica tienen como diana el factor Sp1. Por ejemplo, la mitramicina A (utilizada en esta tesis doctoral) es un antibiótico utilizado desde los años 80 en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y aguda (Queisser et al., 1988). Otro ejemplo es el ácido tolfenámico, un antiinflamatorio no esteroideo con efecto antitumoral porque facilita la degradación de la proteína Sp1 (Abdelrahim et al., 2007). La expresión de Sp1 aumenta durante la fase G1 del ciclo celular y está regulada por la interacción con otros factores nucleares como la proteína de retinoblastoma (pRb), formando un complejo que incrementa la actividad transcripcional de Sp1 (Noe et al., 1998). Por el contrario, los niveles de Sp1 se ven reducidos cuando se sobreexpresa la proteína supresora de tumores p53 (Tapias et al., 2008). La expresión del Sp1 también se encuentra regulada por E2F, un factor nuclear que controla la transcripción de genes esenciales para la progresión del ciclo celular (Nicolas et al., 2003). Además, estudios recientes han demostrado que Sp1 induce la expresión de múltiples genes implicados en proliferación y cáncer como son: *RAB20*, un gen que pertenece a la familia de oncogenes RAS y que se sobreexpresa en numerosos cánceres como el carcinoma de páncreas, adenomas colorectales y cánceres de mama; *FGF21*, un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos implicado en el crecimiento e invasión tumoral; y *ARHGAP18*, una proteína activadora de Rho-GTPasas que se ha identificado como un putativo oncogen que altera la cinética de crecimiento y la morfología celular en la glándula mamaria (Oleaga et al., 2012).

Por último, el componente mejor caracterizado respecto a su implicación en muchos procesos de carcinogénesis es el receptor de EGF. Su activación aberrante contribuye a un aumento en la proliferación y migración celular, evasión de la

apoptosis, invasión tumoral y metástasis (Wells, 1999). De hecho, el estudio de las vías intracelulares asociadas a la activación de los receptores de factores de crecimiento es una de las principales áreas de investigación oncológica ya que están involucradas en diversos mecanismos de progresión tumoral. Se han encontrado niveles elevados de EGFR en una gran variedad de tumores incluyendo gliomas, algunos cánceres de pulmón, próstata, páncreas, mama, cabeza, cuello y ovario (Eccles; Fischer et al., 2007; Ioannou et al.; Martin-Orozco et al., 2007; Xu and Shu, 2007). En carcinomas humanos, lo más frecuente es que se produzca una sobreproducción autocrina de EGF o TGF α , o bien una sobreexpresión del EGFR como consecuencia de una amplificación génica o de anomalías transcripcionales. También se han detectado mutaciones en el genoma que dan lugar a un receptor constitutivamente activo en ausencia de ligando. La elevada expresión de EGFR se correlaciona con mayor progresión tumoral, baja supervivencia, mala respuesta a la terapia antitumoral y resistencia a agentes citotóxicos (Aaronson, 1991; Wells, 1999). Centrándonos en tumores de origen neural, se ha descrito la presencia del EGFR en 10 de 13 líneas de neuroblastomas examinadas por RT-PCR y en el 100% de los neuroblastomas primarios humanos examinados, observándose que el EGF provoca un aumento de la proliferación celular (Ho et al., 2005). Curiosamente, los estudios realizados para analizar las cascadas de señalización acopladas al EGFR que participan en los fenómenos de carcinogénesis, demuestran que la vía de PI3K/Akt, ligada habitualmente a la transmisión de señales de supervivencia, parece jugar un papel importante en el desarrollo tumoral (Ho et al., 2005; Martin-Orozco et al., 2007). De hecho, en varios tipos de cáncer la activación de la vía de PI3K es aberrante (Caino et al., 2009; Holzel et al.), y con frecuencia la subunidad catalítica p110 de la PI3K presenta mutaciones en cánceres de mama, ovario, colonorrectal, endometrio y pulmón (Adams et al., 2011; Hafsi et al., 2011; Steelman et al., 2011). También se ha descrito que la función de Akt se encuentra alterada en algunos tipos de cáncer (Manning and Cantley, 2007).

En conclusión, tal vez el gen P2rx7 no sea más que uno de los cientos de genes implicados en el control del crecimiento celular, diferenciación y muerte cuya expresión se encuentra regulada por Sp1 (Li and Davie, 2010; Yoo et al., 2002). Sin embargo, las evidencias obtenidas en este trabajo de investigación ponen de manifiesto que la cascada de señalización implicada en la regulación de la expresión del receptor P2X7 puede jugar un papel muy importante en el desarrollo de determinados tipos de cáncer, incluyendo los de origen neural.

CONCLUSIONES

1. Las células de neuroblastoma de ratón Neuro-2a expresan a nivel de transcrito y de proteína diversos receptores purinérgicos P2X, siendo el receptor P2X7 el único funcional en esta línea celular.
2. La región promotora proximal del gen *P2xr7* de ratón carece de cajas TATA o CAAT y contiene siete sitios teóricos de unión para el factor Sp1, en su mayoría localizados en las proximidades del sitio de inicio de la transcripción.
3. Los dos sitios Sp1 más cercanos al sitio de inicio de la transcripción son plenamente funcionales y presentan una actividad transcripcional significativa. Además, muestran un alto grado de homología entre diversas especies de mamífero analizadas, tanto en su secuencia de nucleótidos como en su distancia relativa.
4. El factor de transcripción Sp1 induce la expresión del receptor P2X7 nativo en líneas celulares de origen neural (neuroblastoma Neuro-2a) y no neural (macrófagos RAW 264.7), así como en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de corteza cerebral de ratón. En cerebro de ratones recién nacidos se ha confirmado que *in vivo* también se observa una correlación entre la expresión de receptor P2X7 y una mayor expresión del factor de transcripción Sp1.
5. La privación de suero induce la expresión del receptor P2X7 a través de una vía de señalización intracelular iniciada por la auto-activación del receptor de EGF independiente de ligando.
6. La activación del receptor de EGF induce una cascada de señalización que involucra a la vía PI3K/Akt. Akt conduce a la fosforilación de Sp1, favoreciendo así un incremento en la expresión del receptor P2X7.
7. La privación de suero también induce la activación de la PKC ζ que, a su vez, regula negativamente la expresión del gen *P2rx7*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson, S.A. 1991. Growth factors and cancer. *Science*. 254:1146-1153.
- Abbracchio, M.P., J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, M.T. Miras-Portugal, B.F. King, C. Gachet, K.A. Jacobson, G.A. Weisman, and G. Burnstock. 2003. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends in pharmacological sciences*. 24:52-55.
- Abbracchio, M.P., and G. Burnstock. 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & therapeutics*. 64:445-475.
- Abbracchio, M.P., G. Burnstock, J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, G.E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K.A. Jacobson, and G.A. Weisman. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*. 58:281-341.
- Abbracchio, M.P., G. Burnstock, A. Verkhratsky, and H. Zimmermann. 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*. 32:19-29.
- Abdelrahim, M., C.H. Baker, J.L. Abbruzzese, D. Sheikh-Hamad, S. Liu, S.D. Cho, K. Yoon, and S. Safe. 2007. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-1 expression by specificity proteins 1, 3, and 4 in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 67:3286-3294.
- Adams, J.R., N.F. Schachter, J.C. Liu, E. Zacksenhaus, and S.E. Egan. 2011. Elevated PI3K signaling drives multiple breast cancer subtypes. *Oncotarget*. 2:435-447.
- Adinolfi, E., M.G. Callegari, D. Ferrari, C. Bolognesi, M. Minelli, M.R. Wieckowski, P. Pinton, R. Rizzuto, and F. Di Virgilio. 2005. Basal activation of the P2X₇ ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell*. 16:3260-3272.
- Adinolfi, E., M. Cirillo, R. Woltersdorf, S. Falzoni, P. Chiozzi, P. Pellegatti, M.G. Callegari, D. Sandona, F. Markwardt, G. Schmalzing, and F. Di Virgilio. 2010. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X₇ receptor. *FASEB J*. 24:3393-3404.
- Adinolfi, E., L. Melchiorri, S. Falzoni, P. Chiozzi, A. Morelli, A. Tieghi, A. Cuneo, G. Castoldi, F. Di Virgilio, and O.R. Baricordi. 2002. P2X₇ receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood*. 99:706-708.
- Adinolfi, E., L. Raffaghello, A.L. Giuliani, L. Cavazzini, M. Capece, P. Chiozzi, G. Bianchi, G. Kroemer, V. Pistoia, and F. Di Virgilio. 2012. Expression of P2X₇ receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res*. 72:2957-2969.
- Aga, M., C.J. Johnson, A.P. Hart, A.G. Guadarrama, M. Suresh, J. Svaren, P.J. Bertics, and B.J. Darien. 2002. Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X₇. *Journal of leukocyte biology*. 72:222-232.
- Akimoto, K., K. Mizuno, S. Osada, S. Hirai, S. Tanuma, K. Suzuki, and S. Ohno. 1994. A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J Biol Chem*. 269:12677-12683.
- Alberts B, L.J., Raff M, Roberts K, Walter P . . 2002. Molecular biology of the cell.
- Albi, E., S. Cataldi, E. Bartoccini, M.V. Magni, F. Marini, F. Mazzoni, G. Rainaldi, M. Evangelista, and M. Garcia-Gil. 2006. Nuclear sphingomyelin pathway in serum deprivation-induced apoptosis of embryonic hippocampal cells. *J Cell Physiol*. 206:189-195.
- Alloisio, S., C. Cervetto, M. Passalacqua, R. Barbieri, G. Maura, M. Nobile, and M. Marcoli. 2008. Functional evidence for presynaptic P2X₇ receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals. *FEBS Lett*. 582:3948-3953.
- Aranda, A., and A. Pascual. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol*

- Rev. 81:1269-1304.
- Armstrong, S.A., D.A. Barry, R.W. Leggett, and C.R. Mueller. 1997. Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem.* 272:13489-13495.
- Aschrafi, A., S. Sadtler, C. Niculescu, J. Rettinger, and G. Schmalzing. 2004. Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol.* 342:333-343.
- Atkinson, L., T.F. Batten, T.S. Moores, H. Varoqui, J.D. Erickson, and J. Deuchars. 2004. Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience.* 123:761-768.
- Azizkhan, J.C., D.E. Jensen, A.J. Pierce, and M. Wade. 1993. Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Critical reviews in eukaryotic gene expression.* 3:229-254.
- Bae, I.H., M.J. Park, S.H. Yoon, S.W. Kang, S.S. Lee, K.M. Choi, and H.D. Um. 2006. Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1. *Cancer Res.* 66:4991-4995.
- Bahima, L., J. Aleu, M. Elias, M. Martin-Satue, A. Muhaisen, J. Blasi, J. Marsal, and C. Solsona. 2006. Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from Xenopus oocytes. *J Cell Physiol.* 206:95-102.
- Ballestar, E., and M. Esteller. 2008. SnapShot: the human DNA methylome in health and disease. *Cell.* 135:1144-1144 e1141.
- Bandyopadhyay, G., M.L. Standaert, M.P. Sajan, Y. Kanoh, A. Miura, U. Braun, F. Kruse, M. Leitges, and R.V. Farese. 2004. Protein kinase C-lambda knockout in embryonic stem cells and adipocytes impairs insulin-stimulated glucose transport. *Mol Endocrinol.* 18:373-383.
- Bardoni, R., P.A. Goldstein, C.J. Lee, J.G. Gu, and A.B. MacDermott. 1997. ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci.* 17:5297-5304.
- Baricordi, O.R., D. Ferrari, L. Melchiorri, P. Chiozzi, S. Hanau, E. Chiari, M. Rubini, and F. Di Virgilio. 1996. An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood.* 87:682-690.
- Baricordi, O.R., L. Melchiorri, E. Adinolfi, S. Falzoni, P. Chiozzi, G. Buell, and F. Di Virgilio. 1999. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem.* 274:33206-33208.
- Barr, L.F., S.E. Campbell, and S.B. Baylin. 1997. Protein kinase C-beta 2 inhibits cycling and decreases c-myc-induced apoptosis in small cell lung cancer cells. *Cell Growth Differ.* 8:381-392.
- Becker, D., R. Woltersdorf, W. Boldt, S. Schmitz, U. Braam, G. Schmalzing, and F. Markwardt. 2008. The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *J Biol Chem.* 283:25725-25734.
- Bell, R.M., and D.J. Burns. 1991. Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem.* 266:4661-4664.
- Berra, E., M.M. Municio, L. Sanz, S. Frutos, M.T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 1997. Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Mol Cell Biol.* 17:4346-4354.
- Beuvink, I., A. Boulay, S. Fumagalli, F. Zilbermann, S. Ruetz, T. O'Reilly, F. Natt, J. Hall, H.A. Lane, and G. Thomas. 2005. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell.* 120:747-759.

- Bhaskar, P.T., and N. Hay. 2007. The two TORCs and Akt. *Developmental cell*. 12:487-502.
- Bianchi, B.R., K.J. Lynch, E. Touma, W. Niforatos, E.C. Burgard, K.M. Alexander, H.S. Park, H. Yu, R. Metzger, E. Kowaluk, M.F. Jarvis, and T. van Biesen. 1999. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*. 376:127-138.
- Bieberich, E., T. Kawaguchi, and R.K. Yu. 2000. N-acylated serinol is a novel ceramide mimic inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 275:177-181.
- Bird, A.P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 321:209-213.
- Black, A.R., J.D. Black, and J. Azizkhan-Clifford. 2001. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol*. 188:143-160.
- Black, A.R., D. Jensen, S.Y. Lin, and J.C. Azizkhan. 1999. Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *J Biol Chem*. 274:1207-1215.
- Blake, M.C., R.C. Jambou, A.G. Swick, J.W. Kahn, and J.C. Azizkhan. 1990. Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol*. 10:6632-6641.
- Bo, X., L.H. Jiang, H.L. Wilson, M. Kim, G. Burnstock, A. Surprenant, and R.A. North. 2003. Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol Pharmacol*. 63:1407-1416.
- Bobanovic, L.K., S.J. Royle, and R.D. Murrell-Lagnado. 2002. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J Neurosci*. 22:4814-4824.
- Bodin, P., and G. Burnstock. 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical research*. 26:959-969.
- Borgatti, P., A.M. Martelli, G. Tabellini, A. Bellacosa, S. Capitani, and L.M. Neri. 2003. Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin. *J Cell Physiol*. 196:79-88.
- Borner, C., I. Filipuzzi, M. Wartmann, U. Eppenberger, and D. Fabbro. 1989. Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 264:13902-13909.
- Boue-Grabot, E., V. Archambault, and P. Seguela. 2000. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem*. 275:10190-10195.
- Boulay, A., and H.A. Lane. 2007. The mammalian target of rapamycin kinase and tumor growth inhibition. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*. 172:99-124.
- Bourbon, N.A., L. Sandirasegarane, and M. Kester. 2002. Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C ζ : implications for growth arrest. *J Biol Chem*. 277:3286-3292.
- Bouvier, M. 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature reviews*. 2:274-286.
- Bouwman, P., and S. Philipsen. 2002. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol*. 195:27-38.
- Brayer, K.J., and D.J. Segal. 2008. Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. *Cell Biochem Biophys*. 50:111-131.
- Breitkreutz, D., L. Braiman-Wiksman, N. Daum, M.F. Denning, and T. Tennenbaum. 2007. Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol*. 133:793-808.
- Brodeur, G.M. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 3:203-216.

- Brown, E.J., M.W. Albers, T.B. Shin, K. Ichikawa, C.T. Keith, W.S. Lane, and S.L. Schreiber. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 369:756-758.
- Buell, G.N., F. Talabot, A. Gos, J. Lorenz, E. Lai, M.A. Morris, and S.E. Antonarakis. 1998. Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels*. 5:347-354.
- Buettner, R., G. Papoutsoglou, E. Scemes, D.C. Spray, and R. Dermietzel. 2000. Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3201-3206.
- Burgering, B.M., and P.J. Coffey. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 376:599-602.
- Burnstock, G. 1997. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*. 36:1127-1139.
- Burnstock, G. 2007a. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*. 87:659-797.
- Burnstock, G. 2007b. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*. 64:1471-1483.
- Burnstock, G. 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov*. 7:575-590.
- Burnstock, G. 2013. Introduction to purinergic signalling in the brain. *Adv Exp Med Biol*. 986:1-12.
- Burnstock, G., G. Campbell, D. Satchell, and A. Smythe. 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol*. 40:668-688.
- Burnstock, G., B. Dumsday, and A. Smythe. 1972. Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Br J Pharmacol*. 44:451-461.
- Burnstock, G., and G.E. Knight. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International review of cytology*. 240:31-304.
- Burnstock, G., U. Krugel, M.P. Abbracchio, and P. Illes. 2011. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol*. 95:229-274.
- Cabrini, G., S. Falzoni, S.L. Forchap, P. Pellegatti, A. Balboni, P. Agostini, A. Cuneo, G. Castoldi, O.R. Baricordi, and F. Di Virgilio. 2005. A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol*. 175:82-89.
- Caino, M.C., J. Meshki, and M.G. Kazanietz. 2009. Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. *Apoptosis*. 14:392-408.
- Calcerrada, M.C., B.G. Miguel, L. Martin, R.E. Catalan, and A.M. Martinez. 2002. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in nuclear translocation of protein kinase C zeta induced by C2-ceramide in rat hepatocytes. *FEBS Lett*. 514:361-365.
- Cantley, L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296:1655-1657.
- Carrasquero, L.M., E.G. Delicado, L. Sanchez-Ruiloba, T. Iglesias, and M.T. Miras-Portugal. 2010. Mechanisms of protein kinase D activation in response to P2Y(2) and P2X7 receptors in primary astrocytes. *Glia*. 58:984-995.
- Cazzolli, R., L. Carpenter, T.J. Biden, and C. Schmitz-Peiffer. 2001. A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes*. 50:2210-2218.
- Clark, S.J., J. Harrison, and P.L. Molloy. 1997. Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene*. 195:67-71.
- Coddou, C., Z. Yan, T. Obsil, J.P. Huidobro-Toro, and S.S. Stojilkovic. 2011. Activation and

- regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews*. 63:641-683.
- Cohen, S. 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*. 237:1555-1562.
- Cohen, S. 1983. The receptor for epidermal growth factor functions as a tyrosyl-specific kinase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 29:245-247.
- Colombaioni, L., L.M. Frago, I. Varela-Nieto, R. Pesi, and M. Garcia-Gil. 2002. Serum deprivation increases ceramide levels and induces apoptosis in undifferentiated HN9.10e cells. *Neurochemistry international*. 40:327-336.
- Collo, G., S. Neidhart, E. Kawashima, M. Kosco-Vilbois, R.A. North, and G. Buell. 1997. Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 36:1277-1283.
- Compan, V., L. Ulmann, O. Stelmashenko, J. Chemin, S. Chaumont, and F. Rassendren. 2012. P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J Neurosci*. 32:4284-4296.
- Conti, L., S. Sipione, L. Magrassi, L. Bonfanti, D. Rigamonti, V. Pettirossi, M. Peschanski, B. Haddad, P. Pelicci, G. Milanese, G. Pelicci, and E. Cattaneo. 2001. Shc signaling in differentiating neural progenitor cells. *Nature neuroscience*. 4:579-586.
- Cross, D.A., D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B.A. Hemmings. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378:785-789.
- Charles, R., L. Sandrasegarane, J. Yun, N. Bourbon, R. Wilson, R.P. Rothstein, S.W. Levison, and M. Kester. 2000. Ceramide-coated balloon catheters limit neointimal hyperplasia after stretch injury in carotid arteries. *Circ Res*. 87:282-288.
- Chambers, L.J., A.J. Stevens, A.P. Moses, A.D. Michel, D.S. Walter, D.J. Davies, D.G. Livermore, E. Fonfria, E.H. Demont, M. Vimal, P.J. Theobald, P.J. Beswick, R.J. Gleave, S.A. Roman, and S. Senger. 2010. Synthesis and structure-activity relationships of a series of (1H-pyrazol-4-yl)acetamide antagonists of the P2X7 receptor. *Bioorg Med Chem Lett*. 20:3161-3164.
- Chaumont, S., L.H. Jiang, A. Penna, R.A. North, and F. Rassendren. 2004. Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem*. 279:29628-29638.
- Cheewatrakoolpong, B., H. Gilchrest, J.C. Anthes, and S. Greenfeder. 2005. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 332:17-27.
- Chen, C.C., A.N. Akopian, L. Sivilotti, D. Colquhoun, G. Burnstock, and J.N. Wood. 1995. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*. 377:428-431.
- Chen, F., F. Zhang, J. Rao, and G.P. Studzinski. 2000. Ectopic expression of truncated Sp1 transcription factor prolongs the S phase and reduces the growth rate. *Anticancer research*. 20:661-667.
- Chen, J.Y., M.C. Wang, and W.C. Hung. 2009. Transcriptional activation of Skp2 by BCR-ABL in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res*. 33:1520-1524.
- Chen, L., and C.F. Brosnan. 2006. Regulation of immune response by P2X7 receptor. *Critical reviews in immunology*. 26:499-513.
- Chen, X., and M.D. Resh. 2002. Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 277:49631-49637.
- Chessell, I.P., J.P. Hatcher, C. Bountra, A.D. Michel, J.P. Hughes, P. Green, J. Egerton, M. Murfin, J. Richardson, W.L. Peck, C.B. Grahames, M.A. Casula, Y. Yiangou, R. Birch, P. Anand, and G.N. Buell. 2005. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes

- chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 114:386-396.
- Chiang, G.G., and R.T. Abraham. 2007. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends in molecular medicine*. 13:433-442.
- Chou, M.M., W. Hou, J. Johnson, L.K. Graham, M.H. Lee, C.S. Chen, A.C. Newton, B.S. Schaffhausen, and A. Toker. 1998. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol*. 8:1069-1077.
- Christensen, M.A., W. Zhou, H. Qing, A. Lehman, S. Philipsen, and W. Song. 2004. Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. *Mol Cell Biol*. 24:865-874.
- Chu, S., and T.J. Ferro. 2005. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene*. 348:1-11.
- Chuang, J.Y., Y.T. Wang, S.H. Yeh, Y.W. Liu, W.C. Chang, and J.J. Hung. 2008. Phosphorylation by c-Jun NH2-terminal kinase 1 regulates the stability of transcription factor Sp1 during mitosis. *Mol Biol Cell*. 19:1139-1151.
- Dekker, L.V., and P.J. Parker. 1994. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci*. 19:73-77.
- Dempsey, E.C., A.C. Newton, D. Mochly-Rosen, A.P. Fields, M.E. Reyland, P.A. Insel, and R.O. Messing. 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279:L429-438.
- Deuchars, S.A., L. Atkinson, R.E. Brooke, H. Musa, C.J. Milligan, T.F. Batten, N.J. Buckley, S.H. Parson, and J. Deuchars. 2001. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci*. 21:7143-7152.
- Dhand, R., I. Hiles, G. Panayotou, S. Roche, M.J. Fry, I. Gout, N.F. Totty, O. Truong, P. Vicendo, K. Yonezawa, and et al. 1994. PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J*. 13:522-533.
- Di Virgilio, F. 1995. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today*. 16:524-528.
- Di Virgilio, F., D. Ferrari, and E. Adinolfi. 2009. P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal*. 5:251-256.
- Diaz-Hernandez, J.I., R. Gomez-Villafuertes, M. Leon-Otegui, L. Hontecillas-Prieto, A. Del Puerto, J.L. Trejo, J.J. Lucas, J.J. Garrido, J. Gualix, M.T. Miras-Portugal, and M. Diaz-Hernandez. 2011. In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3beta and secretases. *Neurobiol Aging*. 33:1816-1828.
- Diaz-Hernandez, M., A. del Puerto, J.I. Diaz-Hernandez, M. Diez-Zaera, J.J. Lucas, J.J. Garrido, and M.T. Miras-Portugal. 2008. Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci*. 121:3717-3728.
- Diaz-Hernandez, M., M. Diez-Zaera, J. Sanchez-Nogueiro, R. Gomez-Villafuertes, J.M. Canals, J. Alberch, M.T. Miras-Portugal, and J.J. Lucas. 2009. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J*. 23:1893-1906.
- Diaz-Hernandez, M., J. Pintor, E. Castro, and M.T. Miras-Portugal. 2002. Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology*. 42:20-33.
- Disatnik, M.H., G. Buraggi, and D. Mochly-Rosen. 1994. Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res*. 210:287-297.
- Donnelly-Roberts, D.L., and M.F. Jarvis. 2007. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol*. 151:571-579.

- Donnelly-Roberts, D.L., M.T. Namovic, P. Han, and M.F. Jarvis. 2009. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol.* 157:1203-1214.
- Doornbos, R.P. 1999. Protein Kinase Czeta Is a Negative Regulator of Protein Kinase B Activity. *Journal of Biological Chemistry.* 274:8589-8596.
- Doornbos, R.P., M. Theelen, P.C. van der Hoeven, W.J. van Blitterswijk, A.J. Verkleij, and P.M. van Bergen en Henegouwen. 1999. Protein kinase Czeta is a negative regulator of protein kinase B activity. *J Biol Chem.* 274:8589-8596.
- Drury, A.N., and A. Szent-Gyorgyi. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 68:213-237.
- Dubyak, G.R., and C. el-Moatassim. 1993. Signal transduction via P2-purinergeric receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol.* 265:C577-606.
- Dutil, E.M., A. Toker, and A.C. Newton. 1998. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol.* 8:1366-1375.
- Dwivedi, P.P., X.H. Gao, J.C. Tan, A. Evdokiou, A. Ferrante, H.A. Morris, B.K. May, and C.S. Hii. 2010. A role for the phosphatidylinositol 3-kinase--protein kinase C zeta--Sp1 pathway in the 1,25-dihydroxyvitamin D3 induction of the 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase gene in human kidney cells. *Cell Signal.* 22:543-552.
- Dynan, W.S., and R. Tjian. 1983. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell.* 35:79-87.
- Eccles, S.A. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol.* 55:685-696.
- Edwards, F.A., A.J. Gibb, and D. Colquhoun. 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 359:144-147.
- Eickhorst, A.N., A. Berson, D. Cockayne, H.A. Lester, and B.S. Khakh. 2002. Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *The Journal of general physiology.* 120:119-131.
- Eltzschig, H.K., T. Eckle, A. Mager, N. Kuper, C. Karcher, T. Weissmuller, K. Boengler, R. Schulz, S.C. Robson, and S.P. Colgan. 2006. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res.* 99:1100-1108.
- Emili, A., J. Greenblatt, and C.J. Ingles. 1994. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol.* 14:1582-1593.
- Ennion, S.J., and R.J. Evans. 2002. Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol.* 61:303-311.
- Erb, L., Z. Liao, C.I. Seye, and G.A. Weisman. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452:552-562.
- Eslick, G.D., B.V. Thampan, M. Nalos, A.S. McLean, and R. Sluyter. 2009. Circulating interleukin-18 concentrations and a loss-of-function P2X7 polymorphism in heart failure. *Int J Cardiol.* 137:81-83.
- Evangelopoulos, M.E., J. Weis, and A. Kruttgen. 2005. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene.* 24:3309-3318.
- Fan, K. 1983. Preferential synthesis of differentiation related cytoplasmic proteins in low-serum adapted differentiated glioma cells. *Neurosci Lett.* 41:205-210.
- Felder, S., M. Zhou, P. Hu, J. Urena, A. Ullrich, M. Chaudhuri, M. White, S.E. Shoelson,

- and J. Schlessinger. 1993. SH2 domains exhibit high-affinity binding to tyrosine-phosphorylated peptides yet also exhibit rapid dissociation and exchange. *Mol Cell Biol.* 13:1449-1455.
- Feng, Y.H., X. Li, L. Wang, L. Zhou, and G.I. Gorodeski. 2006. A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem.* 281:17228-17237.
- Feng, Y.H., L. Wang, Q. Wang, X. Li, R. Zeng, and G.I. Gorodeski. 2005. ATP stimulates GRK-3 phosphorylation and beta-arrestin-2-dependent internalization of P2X7 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288:C1342-1356.
- Ferrari, D., M. Los, M.K. Bauer, P. Vandenabeele, S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff. 1999. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett.* 447:71-75.
- Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R.M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* 176:3877-3883.
- Ferrari, D., S. Wesselborg, M.K. Bauer, and K. Schulze-Osthoff. 1997. Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol.* 139:1635-1643.
- Filippini, A., R.E. Taffs, T. Agui, and M.V. Sitkovsky. 1990. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *J Biol Chem.* 265:334-340.
- Fischer, B., M. Marinov, and A. Arcaro. 2007. Targeting receptor tyrosine kinase signalling in small cell lung cancer (SCLC): what have we learned so far? *Cancer Treat Rev.* 33:391-406.
- Fischer, W., and U. Krugel. 2007. P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Current medicinal chemistry.* 14:2429-2455.
- Fojas de Borja, P., N.K. Collins, P. Du, J. Azizkhan-Clifford, and M. Mudryj. 2001. Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *EMBO J.* 20:5737-5747.
- Franke, H., K. Klimke, U. Brinckmann, J. Grosche, M. Francke, B. Sperlagh, A. Reichenbach, U.G. Liebert, and P. Illes. 2005. P2X(7) receptor-mRNA and -protein in the mouse retina; changes during retinal degeneration in BALBCrds mice. *Neurochemistry international.* 47:235-242.
- Fruman, D.A., R.E. Meyers, and L.C. Cantley. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 67:481-507.
- Fuller, S.J., L. Stokes, K.K. Skarratt, B.J. Gu, and J.S. Wiley. 2009. Genetics of the P2X7 receptor and human disease. *Purinergic Signal.* 5:257-262.
- Furuchi, T., and R.G. Anderson. 1998. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem.* 273:21099-21104.
- Garcia-Guzman, M., F. Soto, J.M. Gomez-Hernandez, P.E. Lund, and W. Stuhmer. 1997. Characterization of recombinant human P2X4 receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol Pharmacol.* 51:109-118.
- Garcia-Paramio, P., Y. Cabrerizo, F. Bornancin, and P.J. Parker. 1998. The broad specificity of dominant inhibitory protein kinase C mutants infers a common step in phosphorylation. *Biochem J.* 333 (Pt 3):631-636.
- Gargett, C.E., and J.S. Wiley. 1997. The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol.* 120:1483-1490.
- Gendron, F.P., J.T. Neary, P.M. Theiss, G.Y. Sun, F.A. Gonzalez, and G.A. Weisman. 2003.

- Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284:C571-581.
- Gever, J.R., D.A. Cockayne, M.P. Dillon, G. Burnstock, and A.P. Ford. 2006. Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 452:513-537.
- Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N.M. McLaughlin, N.M. Haynes, M.J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 15:1170-1178.
- Glaser, T., R.R. Resende, and H. Ulrich. 2013. Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation. *Cell communication and signaling : CCS.* 11:12.
- Goding, J.W., B. Grobбен, and H. Slegers. 2003. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta.* 1638:1-19.
- Goldberg, H.J., C.I. Whiteside, G.W. Hart, and I.G. Fantus. 2006. Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology.* 147:222-231.
- Gomez-Villafuertes, R., J. Gualix, and M.T. Miras-Portugal. 2001. Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J Neurochem.* 77:84-93.
- Gong, S., C. Zheng, M.L. Doughty, K. Losos, N. Didkovsky, U.B. Schambra, N.J. Nowak, A. Joyner, G. Leblanc, M.E. Hatten, and N. Heintz. 2003. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature.* 425:917-925.
- Goodman, Y., and M.P. Mattson. 1996. Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults, and amyloid beta-peptide toxicity. *J Neurochem.* 66:869-872.
- Gordon, J.L. 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J.* 233:309-319.
- Gorodeski, G.I. 2002. Expression, regulation, and function of P2X(4) purinergic receptor in human cervical epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282:C84-93.
- Greig, A.V., C. Linge, V. Healy, P. Lim, E. Clayton, M.H. Rustin, D.A. McGrouther, and G. Burnstock. 2003. Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *J Invest Dermatol.* 121:315-327.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260:3440-3450.
- Gu, B.J., R. Sluyter, K.K. Skarratt, A.N. Shemon, L.P. Dao-Ung, S.J. Fuller, J.A. Barden, A.L. Clarke, S. Petrou, and J.S. Wiley. 2004. An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem.* 279:31287-31295.
- Gu, B.J., C. Sun, V.A. Valova, K.K. Skarratt, and J.S. Wiley. 2010. Identification of the promoter region of the P2RX4 gene. *Molecular biology reports.* 37:3369-3376.
- Gu, B.J., W. Zhang, R.A. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J.A. Barden, and J.S. Wiley. 2001. A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem.* 276:11135-11142.
- Gualix, J., M.D. Fideu, J. Pintor, P. Rotllan, F. Garcia-Carmona, and M.T. Miras-Portugal. 1997. Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules

- from adrenal medulla. *FASEB J.* 11:981-990.
- Gualix, J., R. Gomez-Villafuertes, M. Diaz-Hernandez, and M.T. Miras-Portugal. 2003. Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J Neurochem.* 87:160-171.
- Gualix, J., J. Pintor, and M.T. Miras-Portugal. 1999. Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem.* 73:1098-1104.
- Guo, C., M. Masin, O.S. Qureshi, and R.D. Murrell-Lagnado. 2007. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* 72:1447-1456.
- Gutierrez-Martin, Y., D. Bustillo, R. Gomez-Villafuertes, J. Sanchez-Nogueiro, C. Torregrosa-Hetland, T. Binz, L.M. Gutierrez, M.T. Miras-Portugal, and A.R. Artalejo. 2011. P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 286:11370-11381.
- Hafsi, S., F.M. Pezzino, S. Candido, G. Ligresti, D.A. Spandidos, Z. Soua, J.A. McCubrey, S. Travalì, and M. Libra. 2011. Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (review). *Int J Oncol.* 40:639-644.
- Haines, W.R., K. Migita, J.A. Cox, T.M. Egan, and M.M. Voigt. 2001. The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. *J Biol Chem.* 276:32793-32798.
- Haltiwanger, R.S., K. Grove, and G.A. Philipsberg. 1998. Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem.* 273:3611-3617.
- Han, I., and J.E. Kudlow. 1997. Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol.* 17:2550-2558.
- Harkness, D.R. 1968. Studies on human placental alkaline phosphatase. II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme. *Arch Biochem Biophys.* 126:513-523.
- Harris, A.L., S. Nicholson, R. Sainsbury, C. Wright, and J. Farndon. 1992. Epidermal growth factor receptor and other oncogenes as prognostic markers. *J Natl Cancer Inst Monogr*:181-187.
- Hart, G.W. 1997. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem.* 66:315-335.
- Hattori, M., and E. Gouaux. 2012. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature.* 485:207-212.
- Heldin, C.H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell.* 80:213-223.
- Hervas, C., R. Perez-Sen, and M.T. Miras-Portugal. 2003. Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *Journal of neuroscience research.* 73:384-399.
- Hervas, C., R. Perez-Sen, and M.T. Miras-Portugal. 2005. Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochemical pharmacology.* 70:770-785.
- Ho, R., J.E. Minturn, T. Hishiki, H. Zhao, Q. Wang, A. Cnaan, J. Maris, A.E. Evans, and G.M. Brodeur. 2005. Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 65:9868-9875.
- Holzel, M., S. Huang, J. Koster, I. Ora, A. Lakeman, H. Caron, W. Nijkamp, J. Xie, T. Callens, S. Asgharzadeh, R.C. Seeger, L. Messiaen, R. Versteeg, and R. Bernards. NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. *Cell.* 142:218-229.
- Honore, P., D. Donnelly-Roberts, M.T. Namovic, G. Hsieh, C.Z. Zhu, J.P. Mikusa, G. Hernandez,

- C. Zhong, D.M. Gauvin, P. Chandran, R. Harris, A.P. Medrano, W. Carroll, K. Marsh, J.P. Sullivan, C.R. Faltynek, and M.F. Jarvis. 2006. A-740003 [N-(1-[(cyanoimino) (5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl) acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 319:1376-1385.
- House, C., and B.E. Kemp. 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science*. 238:1726-1728.
- Housley, G.D., L. Luo, and A.F. Ryan. 1998. Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the adult and developing rat inner ear by in situ hybridization. *The Journal of comparative neurology*. 393:403-414.
- Hu, B., C. Senkler, A. Yang, F. Soto, and B.T. Liang. 2002. P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP. *J Biol Chem*. 277:15752-15757.
- Humphreys, B.D., and G.R. Dubyak. 1996. Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line. *J Immunol*. 157:5627-5637.
- Humphreys, B.D., C. Virginio, A. Surprenant, J. Rice, and G.R. Dubyak. 1998. Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol*. 54:22-32.
- Illes, P., and J. Alexandre Ribeiro. 2004. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur J Pharmacol*. 483:5-17.
- Inoki, K., Y. Li, T. Zhu, J. Wu, and K.L. Guan. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 4:648-657.
- Ioannou, N., A.M. Seddon, A. Dalglish, D. Mackintosh, and H. Modjtahedi. Expression pattern and targeting of HER family members and IGF-1R in pancreatic cancer. *Front Biosci*. 17:2698-2724.
- Ito, T., H. Kitamura, C. Uwatoko, M. Azumano, K. Itoh, and J. Kuwahara. 2010. Interaction of Sp1 zinc finger with transport factor in the nuclear localization of transcription factor Sp1. *Biochem Biophys Res Commun*. 403:161-166.
- Jackson, S.P., and R. Tjian. 1988. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*. 55:125-133.
- Jackson, S.P., and R. Tjian. 1989. Purification and analysis of RNA polymerase II transcription factors by using wheat germ agglutinin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:1781-1785.
- Jacobson, K.A., M.F. Jarvis, and M. Williams. 2002. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem*. 45:4057-4093.
- Jahr, C.E., and T.M. Jessell. 1983. ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature*. 304:730-733.
- Jarvis, M.F., and B.S. Khakh. 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*. 56:208-215.
- Jelassi, B., A. Chantome, F. Alcaraz-Perez, A. Baroja-Mazo, M.L. Cayuela, P. Pelegrin, A. Surprenant, and S. Roger. 2011. P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene*. 30:2108-2122.
- Jewell, J.L., R.C. Russell, and K.L. Guan. 2013. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews*.
- Jia, Z., J. Zhang, D. Wei, L. Wang, P. Yuan, X. Le, Q. Li, J. Yao, and K. Xie. 2007. Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer*

- Res. 67:4878-4885.
- Jiang, L.H., A.B. Mackenzie, R.A. North, and A. Surprenant. 2000. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol.* 58:82-88.
- Jo, Y.H., and L.W. Role. 2002. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci.* 22:4794-4804.
- Jo, Y.H., and R. Schlichter. 1999. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature neuroscience.* 2:241-245.
- Jorgensen, N.R., L.B. Husted, K.K. Skarratt, L. Stokes, C.L. Tofteng, T. Kvist, J.E. Jensen, P. Eiken, K. Brixen, S. Fuller, R. Clifton-Bligh, A. Gartland, P. Schwarz, B.L. Langdahl, and J.S. Wiley. 2012. Single-nucleotide polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with post-menopausal bone loss and vertebral fractures. *European journal of human genetics : EJHG.* 20:675-681.
- Kaczynski, J., T. Cook, and R. Urrutia. 2003. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol.* 4:206.
- Kadonaga, J.T., K.R. Carner, F.R. Masiarz, and R. Tjian. 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.* 51:1079-1090.
- Kahlenberg, J.M., and G.R. Dubyak. 2004. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C1100-1108.
- Katz, M.E., and F. McCormick. 1997. Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr Opin Genet Dev.* 7:75-79.
- Kavurma, M.M., F.S. Santiago, E. Bonfoco, and L.M. Khachigian. 2001. Sp1 phosphorylation regulates apoptosis via extracellular FasL-Fas engagement. *J Biol Chem.* 276:4964-4971.
- Keranen, L.M., E.M. Dutil, and A.C. Newton. 1995. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol.* 5:1394-1403.
- Khakh, B.S., G. Burnstock, C. Kennedy, B.F. King, R.A. North, P. Seguela, M. Voigt, and P.P. Humphrey. 2001. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological reviews.* 53:107-118.
- Khakh, B.S., D. Gittermann, D.A. Cockayne, and A. Jones. 2003. ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci.* 23:7426-7437.
- Khakh, B.S., and R.A. North. 2012. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron.* 76:51-69.
- King BF, T.-N.A. 2003. Nucleoside and nucleotide receptors. *Tocris Review.* 23:1-11.
- Kingsley, C., and A. Winoto. 1992. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol.* 12:4251-4261.
- Kishimoto, A., Y. Takai, T. Mori, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka. 1980. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem.* 255:2273-2276.
- Kolesnick, R.N., and M. Kronke. 1998. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 60:643-665.
- Koller, C.A., and D.M. Miller. 1986. Preliminary observations on the therapy of the myeloid blast phase of chronic granulocytic leukemia with plicamycin and hydroxyurea. *N Engl J Med.* 315:1433-1438.
- Korenaga, R., K. Yamamoto, N. Ohura, T. Sokabe, A. Kamiya, and J. Ando. 2001. Sp1-mediated downregulation of P2X4 receptor gene transcription in endothelial cells exposed to shear stress. *American journal of physiology.* 280:H2214-2221.
- Kovac, J., H. Oster, and M. Leitges. 2007. Expression of the atypical protein kinase C (aPKC)

- isoforms iota/lambda and zeta during mouse embryogenesis. *Gene expression patterns : GEP*. 7:187-196.
- Kovacina, K.S., G.Y. Park, S.S. Bae, A.W. Guzzetta, E. Schaefer, M.J. Birnbaum, and R.A. Roth. 2003. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem*. 278:10189-10194.
- Krishtal, O.A., S.M. Marchenko, and V.I. Pidoplichko. 1983. Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neurosci Lett*. 35:41-45.
- Kukulski, F., S.A. Levesque, E.G. Lavoie, J. Lecka, F. Bigonnesse, A.F. Knowles, S.C. Robson, T.L. Kirley, and J. Seigny. 2005. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal*. 1:193-204.
- Kurokawa, R., J. DiRenzo, M. Boehm, J. Sugarman, B. Gloss, M.G. Rosenfeld, R.A. Heyman, and C.K. Glass. 1994. Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature*. 371:528-531.
- Kutoh, E., J.B. Margot, and J. Schwander. 1999. Identification and characterization of the putative retinoblastoma control element of the rat insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Cancer Lett*. 136:187-194.
- Kuwahara, J., M. Azumano, and T. Takeda. 1999. Nuclear localization of transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Symp Ser*:293-294.
- Lakshmi, S., and P.G. Joshi. 2006. Activation of Src/kinase/phospholipase C/mitogen-activated protein kinase and induction of neurite expression by ATP, independent of nerve growth factor. *Neuroscience*. 141:179-189.
- Larsen, F., G. Gundersen, R. Lopez, and H. Prydz. 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*. 13:1095-1107.
- Lawlor, M.A., and D.R. Alessi. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*. 114:2903-2910.
- Lazarowski, E.R. 2012. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal*. 8:359-373.
- Lazarowski, E.R., R.C. Boucher, and T.K. Harden. 2003. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol*. 64:785-795.
- Le Feuvre, R., D. Brough, and N. Rothwell. 2002. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur J Pharmacol*. 447:261-269.
- Le Good, J.A., W.H. Ziegler, D.B. Parekh, D.R. Alessi, P. Cohen, and P.J. Parker. 1998. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*. 281:2042-2045.
- Leggett, R.W., S.A. Armstrong, D. Barry, and C.R. Mueller. 1995. Sp1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulated upon terminal differentiation of the liver. *J Biol Chem*. 270:25879-25884.
- Leitges, M., L. Sanz, P. Martin, A. Duran, U. Braun, J.F. Garcia, F. Camacho, M.T. Diaz-Meco, P.D. Rennert, and J. Moscat. 2001. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell*. 8:771-780.
- Lemmon, M.A., and J. Schlessinger. 1994. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*. 19:459-463.
- Leon, D., C. Hervas, and M.T. Miras-Portugal. 2006. P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *The European journal of neuroscience*. 23:2999-3013.
- Leon, D., J. Sanchez-Nogueiro, P. Marin-Garcia, and M.A. Miras-Portugal. 2008. Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochemistry international*. 52:1148-1159.

- Li, C.M., S.J. Campbell, D.S. Kumararatne, R. Bellamy, C. Ruwende, K.P. McAdam, A.V. Hill, and D.A. Lammas. 2002a. Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *J Infect Dis.* 186:1458-1462.
- Li, C.M., S.J. Campbell, D.S. Kumararatne, A.V. Hill, and D.A. Lammas. 2002b. Response heterogeneity of human macrophages to ATP is associated with P2X7 receptor expression but not to polymorphisms in the P2RX7 promoter. *FEBS Lett.* 531:127-131.
- Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 69:915-926.
- Li, L., and J.R. Davie. 2010. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft.* 192:275-283.
- Li, X., X. Qi, L. Zhou, D. Cattera, N.S. Rote, J. Potashkin, F.W. Abdul-Karim, and G.I. Gorodeski. 2007. Decreased expression of P2X7 in endometrial epithelial pre-cancerous and cancer cells. *Gynecol Oncol.* 106:233-243.
- Li, X., X. Qi, L. Zhou, W. Fu, F.W. Abdul-Karim, G. MacLennan, and G.I. Gorodeski. 2009. P2X(7) receptor expression is decreased in epithelial cancer cells of ectodermal, uro-genital sinus, and distal paramesonephric duct origin. *Purinergic Signal.* 5:351-368.
- Li, X., L. Zhou, Y.H. Feng, F.W. Abdul-Karim, and G.I. Gorodeski. 2006. The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15:1906-1913.
- Lin, J.W., M. Sugimori, R.R. Llinas, T.L. McGuinness, and P. Greengard. 1990. Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:8257-8261.
- Liu, G.J., J. Brockhausen, and M.R. Bennett. 2003. P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci.* 108:12-16.
- Liu, X., W. Ma, A. Surprenant, and L.H. Jiang. 2008. Identification of the amino acid residues in the extracellular domain of rat P2X(7) receptor involved in functional inhibition by acidic pH. *Br J Pharmacol.*
- Liu, Y., X.S. Liu, L. Wei, R.B. Altman, and S. Batzoglou. 2004. Eukaryotic regulatory element conservation analysis and identification using comparative genomics. *Genome research.* 14:451-458.
- Lucas, M., and V. Sanchez-Margalet. 1995. Protein kinase C involvement in apoptosis. *Gen Pharmacol.* 26:881-887.
- Lynch, K.J., E. Touma, W. Niforatos, K.L. Kage, E.C. Burgard, T. van Biesen, E.A. Kowaluk, and M.F. Jarvis. 1999. Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Mol Pharmacol.* 56:1171-1181.
- Ma, X., Y. Wang, and N.L. Stephens. 1998. Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 274:C1206-1214.
- Maity, A., N. Pore, J. Lee, D. Solomon, and D.M. O'Rourke. 2000. Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res.* 60:5879-5886.
- Majumdar, G., A. Harrington, J. Hungerford, A. Martinez-Hernandez, I.C. Gerling, R. Raghov, and S. Solomon. 2006. Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential o-glycosylation and phosphorylation of sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *J Biol Chem.* 281:3642-3650.

- Manning, B.D., and L.C. Cantley. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 129:1261-1274.
- Marin-Garcia, P. 2007. Receptores de nucleótidos P2X presentes en Sistema Nervioso Central de Ratón: Caracterización y función. *Tesis Doctoral*.
- Marin-Garcia, P., J. Sanchez-Nogueiro, R. Gomez-Villafuertes, D. Leon, and M.T. Miras-Portugal. 2008. Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional P2X7 receptor. *Neuroscience*. 151:361-373.
- Marin, M., A. Karis, P. Visser, F. Grosveld, and S. Philipsen. 1997. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*. 89:619-628.
- Martin-Orozco, R.M., C. Almaraz-Pro, F.J. Rodriguez-Ubreva, M.A. Cortes, S. Roper, R. Colomer, P. Lopez-Ruiz, and B. Colas. 2007. EGF prevents the neuroendocrine differentiation of LNCaP cells induced by serum deprivation: the modulator role of PI3K/Akt. *Neoplasia*. 9:614-624.
- Martín-Orozco, R.M., C. Almaraz-Pro, F.J. Rodríguez-Ubreva, M.A. Cortés, S. Roper, R. Colomer, P. López-Ruiz, and B. Colás. 2007. EGF Prevents the Neuroendocrine Differentiation of LNCaP Cells Induced By Serum Deprivation: The Modulator Role of PI3K/Akt. *Neoplasia*. 9:614-624.
- McCubrey, J.A., L.S. Steelman, W.H. Chappell, S.L. Abrams, G. Montalto, M. Cervello, F. Nicoletti, P. Fagone, G. Malaponte, M.C. Mazzarino, S. Candido, M. Libra, J. Basecke, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, M. Milella, A. Tafuri, L. Cocco, C. Evangelisti, F. Chiarini, and A.M. Martelli. Mutations and Deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Cascades. *Oncotarget*. 3:954-987.
- McGaraughty, S., K.L. Chu, M.T. Namovic, D.L. Donnelly-Roberts, R.R. Harris, X.F. Zhang, C.C. Shieh, C.T. Wismer, C.Z. Zhu, D.M. Gauvin, A.C. Fabiyi, P. Honore, R.J. Gregg, M.E. Kort, D.W. Nelson, W.A. Carroll, K. Marsh, C.R. Faltynek, and M.F. Jarvis. 2007. P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience*. 146:1817-1828.
- McLarnon, J.G., J.K. Ryu, D.G. Walker, and H.B. Choi. 2006. Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 65:1090-1097.
- Messerschmidt, A., S. Macieira, M. Velarde, M. Badeker, C. Benda, A. Jestel, H. Brandstetter, T. Neuefeind, and M. Blaesche. 2005. Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C- ι reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif. *J Mol Biol*. 352:918-931.
- Michel, A.D., L.J. Chambers, W.C. Clay, J.P. Condreay, D.S. Walter, and I.P. Chessell. 2007. Direct labelling of the human P2X7 receptor and identification of positive and negative cooperativity of binding. *Br J Pharmacol*. 151:103-114.
- Miki, A., Y. Tanaka, S. Ogata, and Y. Ikehara. 1986. Selective preparation and characterization of membranous and soluble forms of alkaline phosphatase from rat tissues. A comparison with the serum enzyme. *Eur J Biochem*. 160:41-48.
- Milanini-Mongiat, J., J. Pouyssegur, and G. Pages. 2002. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem*. 277:20631-20639.
- Milanini, J., F. Vinals, J. Pouyssegur, and G. Pages. 1998. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem*. 273:18165-18172.
- Millan, J.L. 2006. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional

- relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal*. 2:335-341.
- Miller, M. 2009. The importance of being flexible: the case of basic region leucine zipper transcriptional regulators. *Current protein & peptide science*. 10:244-269.
- Miras-Portugal, M.T., M. Diaz-Hernandez, L. Giraldez, C. Hervas, R. Gomez-Villafuertes, R.P. Sen, J. Gualix, and J. Pintor. 2003. P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochemical research*. 28:1597-1605.
- Mitchell, F.E., R.M. Marais, and P.J. Parker. 1989. The phosphorylation of protein kinase C as a potential measure of activation. *Biochem J*. 261:131-136.
- Mochly-Rosen, D. 1995. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*. 268:247-251.
- Moghal, N., and P.W. Sternberg. 1999. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol*. 11:190-196.
- Moorefield, K.S., S.J. Fry, and J.M. Horowitz. 2004. Sp2 DNA binding activity and trans-activation are negatively regulated in mammalian cells. *J Biol Chem*. 279:13911-13924.
- Murray, N.R., and A.P. Fields. 1997. Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 272:27521-27524.
- Muthuswamy, S.K., M. Gilman, and J.S. Brugge. 1999. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol*. 19:6845-6857.
- Nagaya, N., R.K. Tittle, N. Saar, S.S. Dellal, and R.I. Hume. 2005. An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. *J Biol Chem*. 280:25982-25993.
- Nakanishi, H., K.A. Brewer, and J.H. Exton. 1993. Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 268:13-16.
- Neid, M., K. Datta, S. Stephan, I. Khanna, S. Pal, L. Shaw, M. White, and D. Mukhopadhyay. 2004. Role of insulin receptor substrates and protein kinase C-zeta in vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*. 279:3941-3948.
- Nelson, D.L.C., Michael M. 2006. Lehninger Principles of Biochemistry.
- Nelson, D.W., R.J. Gregg, M.E. Kort, A. Perez-Medrano, E.A. Voight, Y. Wang, G. Grayson, M.T. Namovic, D.L. Donnelly-Roberts, W. Niforatos, P. Honore, M.F. Jarvis, C.R. Faltynek, and W.A. Carroll. 2006. Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem*. 49:3659-3666.
- Neri, L.M., A.M. Martelli, P. Borgatti, M.L. Colamussi, M. Marchisio, and S. Capitani. 1999. Increase in nuclear phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate synthesis precede PKC-zeta translocation to the nucleus of NGF-treated PC12 cells. *FASEB J*. 13:2299-2310.
- Newton, A.C. 1995. Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr Biol*. 5:973-976.
- Nicke, A. 2008. Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 377:803-808.
- Nicke, A., H.G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler, and G. Schmalzing. 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J*. 17:3016-3028.
- Nicolas, M., V. Noe, and C.J. Ciudad. 2003. Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem J*. 371:265-275.
- Nicolas, M., V. Noe, K.B. Jensen, and C.J. Ciudad. 2001. Cloning and characterization of

- the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp1 gene. *J Biol Chem.* 276:22126-22132.
- Nishikawa, K., A. Toker, F.J. Johannes, Z. Songyang, and L.C. Cantley. 1997. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem.* 272:952-960.
- Nishikawa, R., X.D. Ji, R.C. Harmon, C.S. Lazar, G.N. Gill, W.K. Cavenee, and H.J. Huang. 1994. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:7727-7731.
- Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9:484-496.
- Noe, V., C. Alemany, L.A. Chasin, and C.J. Ciudad. 1998. Retinoblastoma protein associates with SP1 and activates the hamster dihydrofolate reductase promoter. *Oncogene.* 16:1931-1938.
- Norenberg, W., and P. Illes. 2000. Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362:324-339.
- North, R.A. 1996. Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr Opin Cell Biol.* 8:474-483.
- North, R.A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 82:1013-1067.
- North, R.A., and M.F. Jarvis. 2012. P2X Receptors as Drug Targets. *Mol Pharmacol.*
- O'Donnell, N., N.E. Zachara, G.W. Hart, and J.D. Marth. 2004. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol.* 24:1680-1690.
- Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber, and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99:247-257.
- Oleaga, C., S. Welten, A. Belloc, A. Sole, L. Rodriguez, N. Mencia, E. Selga, A. Tapias, V. Noe, and C.J. Ciudad. 2012. Identification of novel Sp1 targets involved in proliferation and cancer by functional genomics. *Biochemical pharmacology.* 84:1581-1591.
- Orr, J.W., L.M. Keranen, and A.C. Newton. 1992. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J Biol Chem.* 267:15263-15266.
- Orr, J.W., and A.C. Newton. 1994a. Intrapeptide regulation of protein kinase C. *J Biol Chem.* 269:8383-8387.
- Orr, J.W., and A.C. Newton. 1994b. Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *J Biol Chem.* 269:27715-27718.
- Ortega, F., R. Perez-Sen, E.G. Delicado, and M.T. Miras-Portugal. 2009. P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotoxicity research.* 15:193-204.
- Ortega, F., R. Perez-Sen, V. Morente, E.G. Delicado, and M.T. Miras-Portugal. 2010. P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci.* 67:1723-1733.
- Pal, S., K.P. Claffey, H.T. Cohen, and D. Mukhopadhyay. 1998. Activation of Sp1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor transcription requires specific interaction with protein kinase C zeta. *J Biol Chem.* 273:26277-26280.
- Pan, Q., S. Yang, Y. Wei, F. Sun, and Z. Li. 2010. SP1 acts as a key factor, contributes to upregulation of ADAM23 expression under serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 401:306-312.
- Pankratov, Y., E. Castro, M.T. Miras-Portugal, and O. Krishtal. 1998. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons

- of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience*. 10:3898-3902.
- Pankratov, Y., U. Lalo, A. Verkhratsky, and R.A. North. 2006. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch*. 452:589-597.
- Papp, L., E.S. Vizi, and B. Sperlagh. 2007. P2X7 receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*. 355:568-574.
- Paratcha, G., and C.F. Ibanez. 2002. Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. *Curr Opin Neurobiol*. 12:542-549.
- Parvathenani, L.K., S. Tertysnikova, C.R. Greco, S.B. Roberts, B. Robertson, and R. Posmantur. 2003. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 278:13309-13317.
- Pawson, T., and J. Schlessingert. 1993. SH2 and SH3 domains. *Curr Biol*. 3:434-442.
- Pellegatti, P., S. Falzoni, P. Pinton, R. Rizzuto, and F. Di Virgilio. 2005. A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell*. 16:3659-3665.
- Pellegatti, P., L. Raffaghello, G. Bianchi, F. Piccardi, V. Pistoia, and F. Di Virgilio. 2008. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One*. 3:e2599.
- Phillips, T. 2008a. Regulation of transcription and gene expression in eukariotes.
- Phillips, T. 2008b. The role of methylation in gene expression. *In Nature Education*.
- Pivorunas, A., J. Savickiene, G. Treigyte, V. Tunaitis, R. Navakauskiene, and K.E. Magnusson. 2007. PI 3-K signaling pathway suppresses PMA-induced expression of p21WAF1/Cip1 in human leukemia cells. *Mol Cell Biochem*. 302:9-18.
- Pore, N., S. Liu, H.K. Shu, B. Li, D. Haas-Kogan, D. Stokoe, J. Milanini-Mongiat, G. Pages, D.M. O'Rourke, E. Bernhard, and A. Maity. 2004. Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell*. 15:4841-4853.
- Queisser, W., F. Herrmann, A. Lindemann, B. Anger, W. Hiddemann, and U. Krey. 1988. Therapy of the blast phase of chronic granulocytic leukemia with mithramycin and hydroxyurea. *Onkologie*. 11:145-146.
- Raffaghello, L., P. Chiozzi, S. Falzoni, F. Di Virgilio, and V. Pistoia. 2006. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res*. 66:907-914.
- Rafty, L.A., and L.M. Khachigian. 2001. Sp1 phosphorylation regulates inducible expression of platelet-derived growth factor B-chain gene via atypical protein kinase C-zeta. *Nucleic Acids Res*. 29:1027-1033.
- Ralevic, V., and G. Burnstock. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews*. 50:413-492.
- Ratray, A.M., and B. Muller. 2012. The control of histone gene expression. *Biochem Soc Trans*. 40:880-885.
- Reddy, C.C., A. Wells, and D.A. Lauffenburger. 1996. Receptor-mediated effects on ligand availability influence relative mitogenic potencies of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Cell Physiol*. 166:512-522.
- Reisinger, K., R. Kaufmann, and J. Gille. 2003. Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J Cell Sci*. 116:225-238.
- Rettinger, J., A. Aschrafi, and G. Schmalzing. 2000. Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J Biol Chem*. 275:33542-33547.

- Riboni, L., A. Prinetti, R. Bassi, A. Caminiti, and G. Tettamanti. 1995. A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma Neuro2a cell differentiation. *J Biol Chem.* 270:26868-26875.
- Ricoult, S.J., and B.D. Manning. 2013. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO reports.*
- Richardson, P.J., and S.J. Brown. 1987. ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem.* 48:622-630.
- Ringerike, T., F.D. Blystad, F.O. Levy, I.H. Madshus, and E. Stang. 2002. Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci.* 115:1331-1340.
- Roberts, J.A., C. Vial, H.R. Digby, K.C. Agboh, H. Wen, A. Atterbury-Thomas, and R.J. Evans. 2006a. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452:486-500.
- Roberts, V.H., S.L. Greenwood, A.C. Elliott, C.P. Sibley, and L.H. Waters. 2006b. Purinergic receptors in human placenta: evidence for functionally active P2X4, P2X7, P2Y2, and P2Y6. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.* 290:R1374-1386.
- Roepstorff, K., P. Thomsen, K. Sandvig, and B. van Deurs. 2002. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem.* 277:18954-18960.
- Romagnoli, R., P.G. Baraldi, O. Cruz-Lopez, C. Lopez-Cara, D. Preti, P.A. Borea, and S. Gessi. 2008. The P2X7 receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 12:647-661.
- Roos, M.D., K. Su, J.R. Baker, and J.E. Kudlow. 1997. O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol.* 17:6472-6480.
- Ruddle, R.J.K.a.F.H. 1969. **Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system** *The journal of Cell Biology.* 43.
- Saffer, J.D., S.P. Jackson, and M.B. Annarella. 1991. Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol.* 11:2189-2199.
- Salinas, M., R. Lopez-Valdaliso, D. Martin, A. Alvarez, and A. Cuadrado. 2000. Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Molecular and cellular neurosciences.* 15:156-169.
- Salter, M.W., Y. De Koninck, and J.L. Henry. 1993. Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol.* 41:125-156.
- Sanchez-Nogueiro, J., P. Marin-Garcia, D. Leon, M. Leon-Otegui, E. Salas, R. Gomez-Villafuertes, J. Gualix, and M.T. Miras-Portugal. 2009. Axodendritic fibres of mouse cerebellar granule neurons exhibit a diversity of functional P2X receptors. *Neurochemistry international.* 55:671-682.
- Sanchez-Nogueiro, J., P. Marin-Garcia, and M.T. Miras-Portugal. 2005. Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice. *FEBS Lett.* 579:3783-3788.
- Sawada, K., N. Echigo, N. Juge, T. Miyaji, M. Otsuka, H. Omote, A. Yamamoto, and Y. Moriyama. 2008. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:5683-5686.
- Sawynok, J., J.W. Downie, A.R. Reid, C.M. Cahill, and T.D. White. 1993. ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain Res.* 610:32-38.
- Schaeper, N.D., N.M. Prpic, and E.A. Wimmer. 2010. A clustered set of three Sp-family genes is ancestral in the Metazoa: evidence from sequence analysis, protein domain structure, developmental expression patterns and chromosomal location. *BMC Evol*

- Biol.* 10:88.
- Schubert, K.M., M.P. Scheid, and V. Duronio. 2000. Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol Chem.* 275:13330-13335.
- Seznec, J., B. Silkenstedt, and U. Naumann. 2011. Therapeutic effects of the Sp1 inhibitor mithramycin A in glioblastoma. *Journal of neuro-oncology.* 101:365-377.
- Shemon, A.N., R. Sluyter, S.L. Fernando, A.L. Clarke, L.P. Dao-Ung, K.K. Skarratt, B.M. Saunders, K.S. Tan, B.J. Gu, S.J. Fuller, W.J. Britton, S. Petrou, and J.S. Wiley. 2006. A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem.* 281:2079-2086.
- Siegfried, Z., S. Eden, M. Mendelsohn, X. Feng, B.Z. Tsuberi, and H. Cedar. 1999. DNA methylation represses transcription in vivo. *Nature genetics.* 22:203-206.
- Simon, J., E.J. Kidd, F.M. Smith, I.P. Chessell, R. Murrell-Lagnado, P.P. Humphrey, and E.A. Barnard. 1997. Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Mol Pharmacol.* 52:237-248.
- Skaper, S.D., P. Debetto, and P. Giusti. 2010. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J.* 24:337-345.
- Skarratt, K.K., S.J. Fuller, R. Sluyter, L.P. Dao-Ung, B.J. Gu, and J.S. Wiley. 2005. A 5' intronic splice site polymorphism leads to a null allele of the P2X7 gene in 1-2% of the Caucasian population. *FEBS Lett.* 579:2675-2678.
- Sneddon, P., T.D. Westfall, L.D. Todorov, S.M. Todorova, D.P. Westfall, P. Nickel, and C. Kennedy. 2000. The effect of P2 receptor antagonists and ATPase inhibition on sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br J Pharmacol.* 129:1089-1094.
- Soloff, R.S., C. Katayama, M.Y. Lin, J.R. Feramisco, and S.M. Hedrick. 2004. Targeted deletion of protein kinase C lambda reveals a distribution of functions between the two atypical protein kinase C isoforms. *J Immunol.* 173:3250-3260.
- Solomon, S.S., G. Majumdar, A. Martinez-Hernandez, and R. Raghaw. 2008. A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones. *Life Sci.* 83:305-312.
- Solsona, C.B., L.; Aleu, J.; Elias, M.; Martín-Satue, M.; Marsal, J.; Blasi, J. . 2004. Endogenous hemichannels and ATP release in *Xenopus oocytes*. *4th International symposium of nucleosides and nucleotides. Chapel Hill.*
- Solle, M., J. Labasi, D.G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B.H. Koller, R.J. Griffiths, and C.A. Gabel. 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem.* 276:125-132.
- Sorensen, P., and E. Wintersberger. 1999. Sp1 and NF-Y are necessary and sufficient for growth-dependent regulation of the hamster thymidine kinase promoter. *J Biol Chem.* 274:30943-30949.
- Soto, F., M. Garcia-Guzman, J.M. Gomez-Hernandez, M. Hollmann, C. Karschin, and W. Stuhmer. 1996. P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3684-3688.
- Spence, M.W. 1993. Sphingomyelinases. *Advances in lipid research.* 26:3-23.
- Spencer, J.A., and R.P. Misra. 1999. Expression of the SRF gene occurs through a Ras/Sp/ SRF-mediated-mechanism in response to serum growth signals. *Oncogene.* 18:7319-7327.
- Sperlagh, B., A. Heinrich, and C. Csolle. 2007. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic Signal.* 3:269-284.
- Sperlagh, B., E.S. Vizi, K. Wirkner, and P. Illes. 2006. P2X7 receptors in the nervous system.

Prog Neurobiol. 78:327-346.

- Spiegel, S., D. Foster, and R. Kolesnick. 1996. Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol.* 8:159-167.
- Stagg, J., U. Divisekera, H. Duret, T. Sparwasser, M.W. Teng, P.K. Darcy, and M.J. Smyth. 2011. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.* 71:2892-2900.
- Steelman, L.S., W.H. Chappell, S.L. Abrams, R.C. Kempf, J. Long, P. Laidler, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, F. Stivala, M.C. Mazzarino, M. Donia, P. Fagone, G. Malaponte, F. Nicoletti, M. Libra, M. Milella, A. Tafuri, A. Bonati, J. Basecke, L. Cocco, C. Evangelisti, A.M. Martelli, G. Montalto, M. Cervello, and J.A. McCubrey. 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY).* 3:192-222.
- Stefan, C., S. Jansen, and M. Bollen. 2005. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci.* 30:542-550.
- Stokes, L., S.J. Fuller, R. Sluyter, K.K. Skarratt, B.J. Gu, and J.S. Wiley. 2010. Two haplotypes of the P2X(7) receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1 β secretion. *FASEB J.* 24:2916-2927.
- Stoyanova, S., G. Bulgarelli-Leva, C. Kirsch, T. Hanck, R. Klinger, R. Wetzker, and M.P. Wymann. 1997. Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma: structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem J.* 324 (Pt 2):489-495.
- Struhl, K. 1999. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell.* 98:1-4.
- Sun, C., J. Chu, S. Singh, and R.D. Salter. 2010. Identification and characterization of a novel variant of the human P2X(7) receptor resulting in gain of function. *Purinergic Signal.* 6:31-45.
- Sun, S.H. 2010. Roles of P2X7 receptor in glial and neuroblastoma cells: the therapeutic potential of P2X7 receptor antagonists. *Mol Neurobiol.* 41:351-355.
- Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R.A. North, and G. Buell. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* 272:735-738.
- Suske, G. 1999. The Sp-family of transcription factors. *Gene.* 238:291-300.
- Suske, G., E. Bruford, and S. Philipsen. 2005. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics.* 85:551-556.
- Suzuki, M.M., and A. Bird. 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 9:465-476.
- Takai, Y., A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori, and Y. Nishizuka. 1979. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J Biol Chem.* 254:3692-3695.
- Tan, N.Y., and L.M. Khachigian. 2009. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol.* 29:2483-2488.
- Tan, N.Y., V.C. Midgley, M.M. Kavurma, F.S. Santiago, X. Luo, R. Peden, R.G. Fahmy, M.C. Berndt, M.P. Molloy, and L.M. Khachigian. 2008. Angiotensin II-inducible platelet-derived growth factor-D transcription requires specific Ser/Thr residues in the second zinc finger region of Sp1. *Circ Res.* 102:e38-51.
- Tapias, A., J. Auriol, D. Forget, J.H. Enzlin, O.D. Scharer, F. Coin, B. Coulombe, and J.M. Egly. 2004. Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *J Biol Chem.* 279:19074-19083.
- Tapias, A., C.J. Ciudad, I.B. Roninson, and V. Noe. 2008. Regulation of Sp1 by cell cycle related

- proteins. *Cell Cycle*. 7:2856-2867.
- Taylor, S.S., and E. Radzio-Andzelm. 1994. Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*. 2:345-355.
- Terrados, G., F. Finkernagel, B. Stielow, D. Sadic, J. Neubert, O. Herdt, M. Krause, M. Scharfe, M. Jarek, and G. Suske. 2012. Genome-wide localization and expression profiling establish Sp2 as a sequence-specific transcription factor regulating vitally important genes. *Nucleic Acids Res.*
- Todorov, L.D., S. Mihaylova-Todorova, T.D. Westfall, P. Sneddon, C. Kennedy, R.A. Bjur, and D.P. Westfall. 1997. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature*. 387:76-79.
- Toker, A. 1998. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci*. 3:D1134-1147.
- Toker, A. 2000. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol*. 57:652-658.
- Toker, A. 2003. PDK-1 and protein kinase C phosphorylation. *Methods Mol Biol*. 233:171-189.
- Torres, G.E., W.R. Haines, T.M. Egan, and M.M. Voigt. 1998. Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol*. 54:989-993.
- Tozaki-Saitoh, H., S. Koizumi, Y. Sato, M. Tsuda, T. Nagao, and K. Inoue. 2006. Retinoic acids increase P2X2 receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC-12 cells. *Mol Pharmacol*. 70:319-328.
- Tsai, F.Y., G. Keller, F.C. Kuo, M. Weiss, J. Chen, M. Rosenblatt, F.W. Alt, and S.H. Orkin. 1994. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 371:221-226.
- Tsuda, M., H. Tozaki-Saitoh, and K. Inoue. 2010. Pain and purinergic signaling. *Brain Res Rev*. 63:222-232.
- Ullrich, A., and J. Schlessinger. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 61:203-212.
- van Blitterswijk, W.J., A.H. van der Luit, R.J. Veldman, M. Verheij, and J. Borst. 2003. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J*. 369:199-211.
- van Weeren, P.C., K.M. de Bruyn, A.M. de Vries-Smiths, J. van Lint, and B.M. Burgering. 1998. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem*. 273:13150-13156.
- Vander Haar, E., S.I. Lee, S. Bandhakavi, T.J. Griffin, and D.H. Kim. 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*. 9:316-323.
- Vanhaesebroeck, B., and D.R. Alessi. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 346 Pt 3:561-576.
- Vanhaesebroeck, B., L. Stephens, and P. Hawkins. 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature reviews*. 13:195-203.
- Vanhaesebroeck, B., M.J. Welham, K. Kotani, R. Stein, P.H. Warne, M.J. Zvelebil, K. Higashi, S. Volinia, J. Downward, and M.D. Waterfield. 1997. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4330-4335.
- Velasco, M., M.J. Diaz-Guerra, P. Diaz-Achirica, D. Andreu, L. Rivas, and L. Bosca. 1997. Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression. *J Immunol*. 158:4437-4443.
- Verhoef, P.A., M. Estacion, W. Schilling, and G.R. Dubyak. 2003. P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J Immunol*. 170:5728-5738.

- Vial, C., J.A. Roberts, and R.J. Evans. 2004. Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends in pharmacological sciences*. 25:487-493.
- Vicart, A., T. Lefebvre, J. Imbert, A. Fernandez, and B. Kahn-Perles. 2006. Increased chromatin association of Sp1 in interphase cells by PP2A-mediated dephosphorylations. *J Mol Biol*. 364:897-908.
- Vieira, A.V., C. Lamaze, and S.L. Schmid. 1996. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science*. 274:2086-2089.
- Virginio, C., D. Church, R.A. North, and A. Surprenant. 1997. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 36:1285-1294.
- Vlahos, C.J., W.F. Matter, K.Y. Hui, and R.F. Brown. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*. 269:5241-5248.
- Vollmayer, P., T. Clair, J.W. Goding, K. Sano, J. Servos, and H. Zimmermann. 2003. Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur J Biochem*. 270:2971-2978.
- von Kugelgen, I. 2006. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & therapeutics*. 110:415-432.
- von Kugelgen, I., and T.K. Harden. 2011. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Advances in pharmacology*. 61:373-415.
- von Kugelgen, I., and K. Starke. 1991. Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 344:419-429.
- von Kugelgen, I., and A. Wetter. 2000. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 362:310-323.
- Vulchanova, L., M.S. Riedl, S.J. Shuster, G. Buell, A. Surprenant, R.A. North, and R. Elde. 1997. Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology*. 36:1229-1242.
- Wang, L., D. Wei, S. Huang, Z. Peng, X. Le, T.T. Wu, J. Yao, J. Ajani, and K. Xie. 2003. Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 9:6371-6380.
- Wang, X., G. Arcuino, T. Takano, J. Lin, W.G. Peng, P. Wan, P. Li, Q. Xu, Q.S. Liu, S.A. Goldman, and M. Nedergaard. 2004. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med*. 10:821-827.
- Wells, A. 1999. EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 31:637-643.
- Werner, P., E.P. Seward, G.N. Buell, and R.A. North. 1996. Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:15485-15490.
- Westover, E.J., D.F. Covey, H.L. Brockman, R.E. Brown, and L.J. Pike. 2003. Cholesterol depletion results in site-specific increases in epidermal growth factor receptor phosphorylation due to membrane level effects. Studies with cholesterol enantiomers. *J Biol Chem*. 278:51125-51133.
- Wewers, M.D., and A. Sarkar. 2009. P2X(7) receptor and macrophage function. *Purinergic Signal*. 5:189-195.
- Whelan, R.D., and P.J. Parker. 1998. Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene*. 16:1939-1944.
- White, N., and G. Burnstock. 2006. P2 receptors and cancer. *Trends in pharmacological sciences*. 27:211-217.

- Wiley, J.S., L.P. Dao-Ung, C. Li, A.N. Shemon, B.J. Gu, M.L. Smart, S.J. Fuller, J.A. Barden, S. Petrou, and R. Sluyter. 2003. An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem.* 278:17108-17113.
- Wymann, M.P., G. Bulgarelli-Leva, M.J. Zvelebil, L. Pirola, B. Vanhaesebroeck, M.D. Waterfield, and G. Panayotou. 1996. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol.* 16:1722-1733.
- Xu, K., and H.K. Shu. 2007. EGFR activation results in enhanced cyclooxygenase-2 expression through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the Sp1/Sp3 transcription factors in human gliomas. *Cancer Res.* 67:6121-6129.
- Xuan Nguyen, T.L., J.W. Choi, S.B. Lee, K. Ye, S.D. Woo, K.H. Lee, and J.Y. Ahn. 2006. Akt phosphorylation is essential for nuclear translocation and retention in NGF-stimulated PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 349:789-798.
- Yang, C., E. Bolotin, T. Jiang, F.M. Sladek, and E. Martinez. 2007. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene.* 389:52-65.
- Yang, X., K. Su, M.D. Roos, Q. Chang, A.J. Paterson, and J.E. Kudlow. 2001. O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:6611-6616.
- Yang, X., F. Zhang, and J.E. Kudlow. 2002. Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell.* 110:69-80.
- Yoo, J., M.J. Jeong, B.M. Kwon, M.W. Hur, Y.M. Park, and M.Y. Han. 2002. Activation of dynamin I gene expression by Sp1 and Sp3 is required for neuronal differentiation of N1E-115 cells. *J Biol Chem.* 277:11904-11909.
- Young, M.T., P. Pelegrin, and A. Surprenant. 2007. Amino acid residues in the P2X7 receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP. *Mol Pharmacol.* 71:92-100.
- Yu, Y., S. Ugawa, T. Ueda, Y. Ishida, K. Inoue, A. Kyaw Nyunt, A. Umemura, M. Mase, K. Yamada, and S. Shimada. 2008. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res.* 1194:45-55.
- Zhang, Y., M. Liao, and M.L. Dufau. 2006. Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase C ζ -induced phosphorylation of Sp1 and p107 repressor release have a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression [corrected] of transcription of the luteinizing hormone receptor gene. *Mol Cell Biol.* 26:6748-6761.
- Zhang, Y., M. Liao, and M.L. Dufau. 2008. Unlocking repression of the human luteinizing hormone receptor gene by trichostatin A-induced cell-specific phosphatase release. *J Biol Chem.* 283:24039-24046.
- Zhao, J., and S.J. Ennion. 2006. Sp1/3 and NF-1 mediate basal transcription of the human P2X1 gene in megakaryoblastic MEG-01 cells. *BMC Mol Biol.* 7:10.
- Zheng, X.L., S. Matsubara, C. Diao, M.D. Hollenberg, and N.C. Wong. 2001. Epidermal growth factor induction of apolipoprotein A-I is mediated by the Ras-MAP kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem.* 276:13822-13829.
- Zhou, L., L. Luo, X. Qi, X. Li, and G.I. Gorodeski. 2009. Regulation of P2X(7) gene transcription. *Purinergic Signal.* 5:409-426.
- Zhou, L., X. Qi, J.A. Potashkin, F.W. Abdul-Karim, and G.I. Gorodeski. 2008. MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *J Biol Chem.* 283:28274-28286.

- Zimmermann, H. 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 49:589-618.
- Zimmermann, H. 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362:299-309.

